

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2005-095027

(43)Date of publication of application : 14.04.2005

(51)Int.Cl. C12N 15/09
A01K 67/027
C12N 5/10

(21)Application number : 2003-330795 (71)Applicant : REPROCELL INC
NAKATSUJI NORIO
TADA TAKASHI
TADA MASAKO

(22)Date of filing : 22.09.2003 (72)Inventor : NAKATSUJI NORIO
TADA TAKASHI
TADA MASAKO

(54) UNDIFFERENTIATED STATE MARKER PROMOTER OF CELL AND ITS UTILIZATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for simply removing undifferentiated ES cells left after a differentiation induction, and to establish an ES cell strain having enhanced safety and exclusively used for grafts.

SOLUTION: The promoter of an undifferentiated specific marker, such as Stm1, is used to easily select and remove the undifferentiated cells left after the differentiation induction. The promoter sequence is a base sequence described in a specific sequence, a polynucleotide having a fragment sequence of the specific sequence, or its modified product.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 19.09.2006

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-95027

(P2005-95027A)

(43) 公開日 平成17年4月14日(2005.4.14)

(51) Int. Cl. ⁷	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09	C 12 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/027	A 0 1 K 67/027	4 B 0 6 5
C 12 N 5/10	C 12 N 5/00 B	

審査請求 未請求 請求項の数 41 O L (全 102 頁)

(21) 出願番号	特願2003-330795 (P2003-330795)	(71) 出願人	503341675 株式会社リプロセル 東京都千代田区内幸町 1-1-1 帝国ホテルタワー6階
(22) 出願日	平成15年9月22日 (2003.9.22)	(71) 出願人	503060880 中辻 慈夫 京都府京都市左京区聖護院川原町 5 3
		(71) 出願人	503060905 多田 高 京都府京都市左京区聖護院川原町 5 3
		(71) 出願人	503060064 多田 政子 京都府京都市左京区聖護院川原町 5 3
		(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞の未分化状態マーカープロモーターおよびその利用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 分化誘導後に残る未分化 E S 細胞の除去を簡便に行うための方法および安全性を高めた移植専用の E S 細胞株の樹立を目的とする。

【解決手段】 S t m 1 などの未分化特異的なマーカーのプロモーターを利用して、分化誘導後に残る未分化細胞を選択することを容易にし、除去することによって上記課題を解決した。前記プロモーター配列は、特定配列に記載の塩基配列又はそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチドまたはその改変体であり得る。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S t m 1 のプロモーター配列を含む核酸構築物。

【請求項 2】

前記プロモーター配列は、

(a) 配列番号 3 4 に記載の塩基配列もしくはそれに対応する塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 3 4 に記載の塩基配列もしくはそれに対応する塩基配列の対立遺伝子変異体またはそのフラグメントである、ポリヌクレオチド；

(c) (a) ~ (b) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(d) (a) ~ (c) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 7 0 % である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

を含む、

請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 3】

少なくとも 1 0 の連続するヌクレオチド長を有する、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 4】

前記生物学的活性は、プロモーター活性である、請求項 2 に記載の核酸構築物。

【請求項 5】

前記プロモーターとは異なる由来の外来遺伝子をコードする配列を、前記プロモーター配列に対して作動可能に連結されて、含む、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 6】

前記外来遺伝子は、選択マーカーをコードする、請求項 5 に記載の核酸構築物。

【請求項 7】

前記選択マーカーは、前記核酸構築物が導入される宿主の培地での選択を可能にする、請求項 6 に記載の核酸構築物。

【請求項 8】

前記選択マーカーは、前記核酸構築物が導入される宿主での視覚での選択を可能にする、請求項 6 に記載の核酸構築物。

【請求項 9】

前記選択マーカーは、ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (h p r t) 、または緑色蛍光プロテイン (G F P) 、青色蛍光プロテイン (C F P) 、黄色蛍光プロテイン (Y F P) および赤色蛍光プロテイン (d s R e d) からなる群より選択される蛍光マーカーを含む、請求項 6 に記載の核酸構築物。

【請求項 1 0】

前記選択マーカーは、前記核酸構築物が導入される宿主に対して実質的に毒性を示さない、請求項 6 に記載の核酸構築物。

【請求項 1 1】

請求項 1 に記載の核酸構築物を含む、ベクター。

【請求項 1 2】

請求項 1 に記載の核酸構築物を含む、細胞。

【請求項 1 3】

前記細胞は、前記プロモーター配列とは異種である、請求項 1 2 に記載の細胞。

【請求項 1 4】

請求項 1 に記載の核酸構築物を含む、組織。

【請求項 1 5】

請求項 1 に記載の核酸構築物を含む、臓器。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の核酸構築物を含む、生物。

【請求項 17】

未分化細胞から未分化細胞を実質的に含まない分化細胞の集団を生産する方法であって、

- a) 選択マーカールを含まない未分化細胞を提供する工程；
 - b) 未分化状態に特異的なプロモーターをコードする配列と該選択マーカール遺伝子とコードする配列とが作動可能に連結された配列を有する核酸構築物を、該未分化細胞に導入する工程；
 - c) 該選択マーカールを含む細胞を選択的に増殖させる培地に該未分化細胞を配置する工程；
 - d) 該未分化細胞を分化誘導する工程；および
 - e) 該選択マーカールの発現の有無を選択し得る培地に分化された該未分化細胞を配置し、培養する工程、
- を包含する、方法。

10

【請求項 18】

前記未分化状態に特異的なプロモーターは、S t m 1 のプロモーター配列を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 S t m 1 のプロモーター配列は、T T T T G C A T T A C A A T G (O c t / S o x モチーフ配列) またはその改変体を含む、請求項 18 に記載の方法。

20

【請求項 20】

前記 S t m 1 のプロモーター配列は、配列番号 31、32 または 33 に示す配列またはその改変体を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 S t m 1 のプロモーター配列は、配列番号 31、32 または 33 に示す配列またはその改変体を含み、かつ、転写開始配列の上流約 2、3 k b の全部あるいは一部を含む配列またはその改変体を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

前記選択マーカールは、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (h p r t)、または緑色蛍光プロテイン (G F P)、青色蛍光プロテイン (C F P)、黄色蛍光プロテイン (Y F P) および赤色蛍光プロテイン (d s R e d) からなる群より選択される蛍光マーカールを含む、請求項 17 に記載の方法。

30

【請求項 23】

前記未分化細胞は、胚性幹細胞を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 24】

前記分化誘導は、神経細胞、筋肉細胞、脂肪細胞、色素細胞、幹細胞、血球系細胞、腺細胞、血管内皮細胞、粘膜上皮細胞および皮膚細胞からなる群より選択される細胞への分化を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 25】

前記培養後、未分化状態に特異的なマーカールによって、未分化細胞の混入率を確認する工程をさらに包含する、請求項 17 に記載の方法。

40

【請求項 26】

前記未分化状態に特異的なマーカールは、S t m 抗体または O c t 3 / 4 抗体を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記選択マーカールを含まない未分化細胞を樹立する工程をさらに包含する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 28】

前記細胞は、マウス、サルおよびヒトからなる群より選択される細胞を含む、請求項 17 に記載の方法。

50

【請求項 29】

前記遺伝子の導入は、トランスフェクション、形質転換および形質導入からなる群より選択される技術を用いる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 30】

前記分化誘導は、培養条件下での分化誘導、胚様体形成による初期胚組織細胞への分化誘導、免疫不全動物への移植による奇形腫形成、胚盤胞または初期胚への移植によるキメラ胚形成、および除核未受精卵への核移植へのクローン胚または動物の作製からなる群より選択される誘導を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 31】

前記培養後、分化細胞のみを選択する工程をさらに包含する、請求項 17 に記載の方法。 10

【請求項 32】

請求項 17 に記載の方法によって生産される、分化細胞集団。

【請求項 33】

請求項 17 に記載の方法によって生産される分化細胞集団に由来する、組織。

【請求項 34】

請求項 17 に記載の方法によって生産される分化細胞集団に由来する、臓器。

【請求項 35】

未分化細胞から未分化細胞を実質的に含まない分化細胞の集団を生産する方法であって、

a) S t m 1 のプロモーター配列と該選択マーカー遺伝子とコードする配列とが作動可能に連結された配列を有する核酸構築物を、未分化細胞に導入する工程； 20

b) 該未分化細胞を培養し分化誘導する工程；および

c) 該選択マーカーの発現の有無に基づいて未分化細胞を除去する工程、を包含する、方法。

【請求項 36】

前記選択マーカーは、視覚による識別を可能にする、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記選択マーカーは、G F P である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

前記除去は、セルソーターを用いて行われる、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 39】

請求項 35 に記載の方法によって生産される、分化細胞集団。 30

【請求項 40】

請求項 35 に記載の方法によって生産される分化細胞集団に由来する、組織。

【請求項 41】

請求項 35 に記載の方法によって生産される分化細胞集団に由来する、臓器。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞の未分化状態マーカープロモーターおよびその利用に関する。より詳細には、本発明は、分化した幹細胞の移植の安全性を高めるための方法に関する。 40

【背景技術】

【0002】

生物の個体は特有の機能を発揮する様々な組織細胞の集合体として形作られている。高等生物では、この源となる細胞はたった 1 個の受精卵である。この受精卵と同様の多分化能をもつ細胞が幹細胞である。多分化能とはどのような分子機構によって獲得および維持されるものかという基礎生物学的な興味に加え、近年では再生医療への応用が脚光を浴び、幹細胞研究の重要性が増している。幹細胞研究を推進する上で未分化細胞に特異的に発現する遺伝子の同定が必須になる。これまで未分化細胞特異的遺伝子として、O c t 3 / 4 , U T F 1 , S o x 1 , R e x 1 等の遺伝子が報告されているが U T F 1 , S o x 1 , R e x 1 は分化細胞でも発現が見られる。したがって、現在知られる未分化細胞特異的遺伝 50

子としては、Oct 3/4のみが未分化細胞に比較的厳密に特異的といえる。

【0003】

Oct 3/4は遺伝子欠損の実験から未分化維持に必須であることが明らかになっている。また、この遺伝子の遺伝子発現量により分化の方向が決定されているらしい（非特許文献1）。Oct 3/4を中心としてその上流および下流に位置する遺伝子の同定により未分化維持機構の解明が待たれている。Oct 3/4遺伝子の発現が未分化のどの状態を反映するかは現在も不明のままであるが、未分化細胞の重要なマーカー遺伝子であることは間違いない。Oct 3/4遺伝子のプロモーターの制御下にレポーター蛍光遺伝子であるGFP（Green Fluorescence Protein）等をつないだ外来遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは、GFPの発現により未分化な生細胞の精製が可能になってきている。 10

【0004】

上述のように、Oct 3/4のような未分化状態を判定するためのツールはあるものの、Oct 3/4などの遺伝子は、未分化状態でない場合にも発現することがあることから、真の意味でのマーカーとして使用することができない。また、Oct 3/4は、胚性幹細胞で発現がみられるものの、未受精卵細胞において発現が見られたり、他の幹細胞（たとえば組織幹細胞）では発現が消失することから、多能性のマーカーとしての精確度は完全ではなく、その用途も限定されている。

【0005】

近年胚性幹（ES）細胞のような未分化細胞の利用が頻繁に行われるようになってきている。なぜなら、胚性幹細胞は、あらゆる組織細胞に分化誘導可能なことから、細胞移植治療の細胞供給源として利用できるからである。しかし、移植細胞には拒絶反応があり、かつ、分化しそこなった幹細胞が移植後にテラトーマを形成する可能性を否定できないという大きな問題がある。 20

【非特許文献1】Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat Genet 24, 372-376

【発明の開示】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、本発明は、分化誘導後に残る未分化ES細胞の除去を簡便に行うための方法および安全性を高めた移植専用のES細胞株の樹立を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、Stm1などの未分化特異的なマーカーのプロモーターを、利用して、分化誘導後に残る未分化細胞を洗濯することを容易にし、除去することによって上記課題を解決した。

【0008】

40

したがって、本発明は以下を提供する。

- (1) Stm1のプロモーター配列を含む核酸構築物。
- (2) 上記プロモーター配列は、
 - (a) 配列番号34に記載の塩基配列もしくはそれに対応する塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；
 - (b) 配列番号34に記載の塩基配列もしくはそれに対応する塩基配列の対立遺伝子変異体またはそのフラグメントである、ポリヌクレオチド；
 - (c) (a)～(b)のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド 50

ド；または

(d) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む、

項目1に記載の核酸構築物。

(3) 少なくとも10の連続するヌクレオチド長を有する、項目1に記載の核酸構築物。

(4) 上記生物学的活性は、プロモーター活性である、項目2に記載の核酸構築物。

(5) 上記プロモーターとは異なる由来の外来遺伝子をコードする配列を、上記プロモーター配列に対して作動可能に連結されて、含む、項目1に記載の核酸構築物。 10

(6) 上記外来遺伝子は、選択マーカーをコードする、項目5に記載の核酸構築物。

(7) 上記選択マーカーは、上記核酸構築物が導入される宿主の培地での選択を可能にする、項目6に記載の核酸構築物。

(8) 上記選択マーカーは、上記核酸構築物が導入される宿主での視覚での選択を可能にする、項目6に記載の核酸構築物。

(9) 上記選択マーカーは、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (hprt)、または緑色蛍光プロテイン (GFP)、青色蛍光プロテイン (CFP)、黄色蛍光プロテイン (YFP) および赤色蛍光プロテイン (dsRed) からなる群より選択される蛍光マーカーを含む、項目6に記載の核酸構築物。 20

(10) 上記選択マーカーは、上記核酸構築物が導入される宿主に対して実質的に毒性を示さない、項目6に記載の核酸構築物。

(11) 項目1に記載の核酸構築物を含む、バクテリア。

(12) 項目1に記載の核酸構築物を含む、細胞。

(13) 上記細胞は、上記プロモーター配列とは異種である、項目12に記載の細胞。

(14) 項目1に記載の核酸構築物を含む、組織。

(15) 項目1に記載の核酸構築物を含む、臓器。

(16) 項目1に記載の核酸構築物を含む、生物。

(17) 未分化細胞から未分化細胞を実質的に含まない分化細胞の集団を生産する方法であって、 30

a) 選択マーカーを含まない未分化細胞を提供する工程；

b) 未分化状態に特異的なプロモーターをコードする配列と上記選択マーカー遺伝子とコードする配列とが作動可能に連結された配列を有する核酸構築物を、上記未分化細胞に導入する工程；

c) 上記選択マーカーを含む細胞を選択的に増殖させる培地に上記未分化細胞を配置する工程；

d) 上記未分化細胞を分化誘導する工程；および

e) 上記選択マーカーの発現の有無を選択し得る培地に分化された上記未分化細胞を配置し、培養する工程、を包含する、方法。 40

(18) 上記未分化状態に特異的なプロモーターは、Stm1のプロモーター配列を含む、項目17に記載の方法。

(19) 上記Stm1のプロモーター配列は、TTTTCGAT TACAAATG (Oct/Soxモチーフ配列；ここで、TTTTCGATは、Octモチーフ配列であり、TACAAATGはSoxモチーフ配列である) またはその改変体を含む、項目18に記載の方法。

(20) 上記Stm1のプロモーター配列は、転写開始点から上流390bp (例えば、配列番号31、32または33に示す配列) またはその改変体を含む、項目18に記載の方法。

(21) 上記Stm1のプロモーター配列は、配列番号31、32または33に示す配 50

列またはその改変体を含み、かつ、転写開始配列の上流約 2、3 kb の全部あるいは一部を含む配列またはその改変体を含む、項目 18 に記載の方法。

(22) 上記選択マーカーは、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (hprt)、または緑色蛍光プロテイン (GFP)、青色蛍光プロテイン (CFP)、黄色蛍光プロテイン (YFP) および赤色蛍光プロテイン (dsRed) からなる群より選択される蛍光マーカーを含むを含む、項目 17 に記載の方法。

(23) 上記未分化細胞は、胚性幹細胞を含む、項目 17 に記載の方法。

(24) 上記分化誘導は、神経細胞、筋肉細胞、脂肪細胞、色素細胞、幹細胞、血球系細胞、脾細胞、血管内皮細胞、粘膜上皮細胞および皮膚細胞からなる群より選択される細胞への分化を含む、項目 17 に記載の方法。

10

(25) 上記培養後、未分化状態に特異的なマーカーによって、未分化細胞の混入率を確認する工程をさらに包含する、項目 17 に記載の方法。

(26) 上記未分化状態に特異的なマーカーは、Stm抗体またはOct 3/4抗体を含む、請求工 25 に記載の方法。

(27) 上記選択マーカーを含まない未分化細胞を樹立する工程をさらに包含する、項目 17 に記載の方法。

(28) 上記細胞は、マウス、サルおよびヒトからなる群より選択される細胞を含む、項目 17 に記載の方法。

(29) 上記遺伝子の導入は、トランスフェクション、形質転換および形質導入からなる群より選択される技術を用いる、項目 17 に記載の方法。

20

(30) 上記分化誘導は、培養条件下での分化誘導 (例えば、神経細胞、血管内皮細胞、筋肉細胞、色素細胞、脾細胞などの特定組織細胞への分化誘導)、胚様体 (embryoid body) 形成による初期胚組織細胞への分化誘導 (例えば、神経、血球系、生殖細胞など)、免疫不全動物への移植による奇形腫 (テラトーマ) 形成、胚盤胞または初期胚への移植によるキメラ胚形成、および除核未受精卵への核移植へのクローン胚または動物の作製からなる群より選択される誘導を含む、項目 17 に記載の方法。

(31) 上記培養後、分化細胞のみを選択する工程をさらに包含する、項目 17 に記載の方法。

(32) 項目 17 に記載の方法によって生産される、分化細胞集団。

(33) 項目 17 に記載の方法によって生産される分化細胞集団に由来する、組織。

30

(34) 項目 17 に記載の方法によって生産される分化細胞集団に由来する、臓器。

(35) 未分化細胞から未分化細胞を實質的に含まない分化細胞の集団を生産する方法であって、

a) Stm1 のプロモーター配列と上記選択マーカー遺伝子とコードする配列とが作動可能に連結された配列を有する核酸構築物を、未分化細胞に導入する工程；

b) 上記未分化細胞を培養し分化誘導する工程；および

c) 上記選択マーカーの発現の有無に基づいて未分化細胞を除去する工程、を包含する、方法。

(36) 上記選択マーカーは、視覚による識別を可能にする、項目 35 に記載の方法。

(37) 上記選択マーカーは、GFP である、項目 35 に記載の方法。

40

(38) 上記除去は、セルソーターを用いて行われる、項目 35 に記載の方法。

(39) 項目 35 に記載の方法によって生産される、分化細胞集団。

(40) 項目 35 に記載の方法によって生産される分化細胞集団に由来する、組織。

(41) 項目 35 に記載の方法によって生産される分化細胞集団に由来する、臓器。

【0009】

以下に、本発明の好ましい実施形態を示すが、当業者は本発明の説明および添付の図面、ならびに当上記分野における周知慣用技術からその実施形態などを適宜実施することができ、本発明が奏する作用および効果を容易に理解することが認識されるべきである。

【発明の効果】

【0010】

50

未分化状態の判定、全能性、多能性のより詳細な判定など、従来の因子では不可能であった、幹細胞の精確な判定が達成された。また、本発明の方法を用いれば、ES細胞、胚細胞などの幹細胞の精製を効率よく行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

【0012】

10

(用語)

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

【0013】

本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本明細書において使用される細胞は、天然に存在する細胞であっても、人工的に改変された細胞（例えば、融合細胞、遺伝子改変細胞）であってもよい。細胞の供給源としては、例えば、単一の細胞培養物であり得、あるいは、正常に成長したトランスジェニック動物の胚、血液、または体組織、または正常に成長した細胞株由来の細胞のような細胞混合物が挙げられるがそれらに限定されない。

20

【0014】

本明細書において「幹細胞」とは、自己複製能を有し、多分化能（すなわち多能性）（「*pluripotency*」）を有する細胞をいう。幹細胞は通常、組織が傷害を受けたときにその組織を再生することができる。本明細書では幹細胞は、胚性幹（ES）細胞または組織幹細胞（組織性幹細胞、組織特異的幹細胞または体性幹細胞ともいう）であり得るがそれらに限定されない。また、上述の能力を有している限り、人工的に作製した細胞（たとえば、本明細書において記載される融合細胞、再プログラム化された細胞など）もまた、幹細胞であり得る。胚性幹細胞とは初期胚に由来する多能性幹細胞をいう。胚性幹細胞は、1981年に初めて樹立され、1989年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。1998年にはヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。組織幹細胞は、胚性幹細胞とは異なり、分化の方向が限定されている細胞であり、組織中の特定の位置に存在し、未分化な細胞内構造をしている。従って、組織幹細胞は多能性のレベルが低い。組織幹細胞は、核/細胞質比が高く、細胞内小器官が乏しい。組織幹細胞は、概して、多分化能を有し、細胞周期が遅く、個体の一生以上に増殖能を維持する。本明細書において使用される場合は、幹細胞は好ましくは胚性幹細胞であり得るが、状況に応じて組織幹細胞も使用され得る。

30

【0015】

由来する部位により分類すると、組織幹細胞は、例えば、皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系などに分けられる。皮膚系の組織幹細胞としては、表皮幹細胞、毛嚢幹細胞などが挙げられる。消化器系の組織幹細胞としては、膵（共通）幹細胞、肝幹細胞などが挙げられる。骨髄系の組織幹細胞としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞などが挙げられる。神経系の組織幹細胞としては、神経幹細胞、網膜幹細胞などが挙げられる。

40

【0016】

本明細書において「体細胞」とは、卵子、精子などの生殖細胞以外の細胞であり、そのDNAを次世代に直接引き渡さない全ての細胞をいう。体細胞は通常、多能性が限定されているかまたは消失している。本明細書において使用される体細胞は、天然に存在するものであってもよく、遺伝子改変されたものであってもよい。

【0017】

細胞は、由来により、外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来する幹細胞に分類され得る。

50

外胚葉由来の細胞は、主に脳に存在し、神経幹細胞などが含まれる。中胚葉由来の細胞は、主に骨髄に存在し、血管幹細胞、造血幹細胞および間葉系幹細胞などが含まれる。内胚葉由来の細胞は主に臓器に存在し、肝幹細胞、膵幹細胞などが含まれる。本明細書では、体細胞はどのような胚葉由来でもよい。好ましくは、体細胞は、リンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞が使用され得る。

【0018】

本明細書において「単離された」とは、通常環境において天然に付随する物質が少なくとも低減されていること、好ましくは実質的に含まないをいう。従って、単離された細胞とは、天然環境において付随する他の物質（たとえば、他の細胞、タンパク質、核酸など）を実質的に含まない細胞をいう。核酸またはポリペプチドについていう場合、「単離された」とは、たとえば、組換えDNA技術により作製された場合には細胞物質または培養培地を実質的に含まず、化学合成された場合には前駆体化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない、核酸またはポリペプチドを指す。単離された核酸は、好ましくは、その核酸が由来する生物において天然に該核酸に隣接している（flanking）配列（即ち、該核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。

【0019】

本明細書において、「樹立された」または「確立された」細胞とは、特定の性質（例えば、多分化能）を維持し、かつ、細胞が培養条件下で安定に増殖し続けるようになった状態をいう。したがって、樹立された幹細胞は、多分化能を維持する。本発明では、樹立された幹細胞を使用することは、宿主から新たに幹細胞を採取するという工程を回避することができるので好ましい。

【0020】

本明細書において、「非胚性」とは、初期胚に直接由来しないことをいう。従って、初期胚以外の身体部分に由来する細胞がこれに該当するが、胚性幹細胞に改変（例えば、遺伝的改変、融合など）を加えて得られる細胞もまた、非胚性細胞の範囲内にある。

【0021】

本明細書において「分化（した）細胞」とは、機能および形態が特異化した細胞（例えば、筋細胞、神経細胞など）をいい、幹細胞とは異なり、多能性はないか、またはほとんどない。分化した細胞としては、例えば、表皮細胞、膵実質細胞、膵管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられる。従って、本発明の1つの実施形態において、本発明のStm遺伝子を発現させた細胞は、起源として分化細胞を用いても、多能性を獲得することができる。

【0022】

本明細書において、「分化」または「細胞分化」とは、1個の細胞の分裂によって由来した娘細胞集団の中で形態的および/または機能的に質的な差をもった二つ以上のタイプの細胞が生じてくる現象をいう。従って、元来特別な特徴を検出できない細胞に由来する細胞集団（細胞系譜）が、特定のタンパク質の産生などはっきりした特徴を示すに至る過程も分化に包含される。現在では細胞分化を、ゲノム中の特定の遺伝子群が発現した状態と考えることが一般的であり、このような遺伝子発現状態をもたらす細胞内あるいは細胞外の因子または条件を探索することにより細胞分化を同定することができる。細胞分化の結果は原則として安定であって、特に動物細胞では、別のタイプの細胞に分化することは例外的にしか起こらない。従って、本発明のStm遺伝子は、未分化細胞のマーカーとして非常に有用であり得る。

【0023】

本明細書において「多能性」または「多分化能」とは、互換可能に用いられ、細胞の性質をいい、1以上、好ましくは2以上の種々の組織または臓器に分化し得る能力をいう。従って、「多能性」および「多分化能」は、本明細書においては特に言及しない限り「未分化」と互換可能に用いられる。通常、細胞の多能性は発生が進むにつれて制限され、成体では一つの組織または器官の構成細胞が別のものの細胞に変化することは少ない。従っ

て多能性は通常失われている。とくに上皮性の細胞は他の上皮性細胞に変化しにくい。これが起きる場合通常病的な状態であり、化生 (metaplasia) と呼ばれる。しかし間葉系細胞では比較的単純な刺激で他の間葉性細胞にかわり化生を起こしやすいので多能性の程度は高い。胚性幹細胞は、多能性を有する。組織幹細胞は、多能性を有する。本明細書において、多能性のうち、受精卵のように生体を構成する全ての種類の細胞に分化する能力は全能性といい、多能性は全能性の概念を包含し得る。ある細胞が多能性を有するかどうかは、たとえば、体外培養系における、胚様体 (Embryoid Body) の形成、分化誘導条件下での培養等が挙げられるがそれらに限定されない。また、生体を用いた多能性の有無についてのアッセイ法としては、免疫不全マウスへの移植による奇形種 (テラトーマ) の形成、胚盤胞への注入によるキメラ胚の形成、生体組織への移植、腹水への注入による増殖等が挙げられるがそれらに限定されない。 10

【0024】

本明細書において、多能性のうち、受精卵のように生体を構成する全ての種類の細胞に分化する能力は「全能性」といい、多能性は全能性の概念を包含し得る。ただし、明確に区別する場合は、全能性と多能性とは区別され得、前者はどのような細胞へも分化し得る能力をいい、後者は、複数の方向を有するが、生物が可能なすべての方向には分化できない能力を有することをいう。また、1つの方向にのみ分化する能力は、単能性ともいう。

【0025】

本明細書において全能性と多能性とは、例えば、受精後の日数により判定することができ、例えば、マウスであれば、受精後約8日を基準として区別され得る。理論に束縛されないが、マウスでは、受精後、以下のような経過をたどることが通常である。受精後6.5日 (E 6.5とも表記する) では、原始線条 (原条ともいう) がエピブラストの片側に出現し、胚の将来の前後軸が明らかになる。原条は、胚の将来の後方端を示し、外胚葉を横切って円筒の遠位端まで達する。原条は、細胞運動が行われる領域であり、その結果、将来の内胚葉と中胚葉とが形成されることになる。E 7.5までに結節の前方に頭部突起が出現し、この部分には脊索と、それを取り囲んで下層には将来の内胚葉、上層には神経板が形成されることになる。結節は、E 6.5日ごろから現れ、後方へと移動し、軸構造が前から後ろへと形成される。E 8.5日までに胚は幾分枝が長くなり、その前端には大部分前方神経板からなる大きな頭部ヒダが形成される。体節はE 8日から1.5時間に1個の割合で前方から後方へと形成され始める。この時期を越えた細胞は、仮に胎盤に戻したとしても、脱分化をしない限りもはや全能性を示さず、個体を形成しない。これより前では特別の処理をしなくても全能性を示し得ることから、この点が全能性の分岐点であるといえる。このことは、ES細胞がこれ以降の胚から樹立することが困難であり、これ以降の胚からは通常EG (生殖細胞由来) 細胞と呼ばれる細胞が樹立されることから、そのような意味でも分岐点であるといえる。したがって、1つの局面において、本発明のStm1は、全能性の有無またはES細胞の出発材料としての適切性を判断するのに使用することができるといえる。 20 30

【0026】

本発明で用いられる細胞は、どの生物由来の細胞 (たとえば、任意の種類の多細胞生物 (例えば、動物 (たとえば、脊椎動物、無脊椎動物)、植物 (たとえば、単子葉植物、双子葉植物など) など)) でもよい。好ましくは、脊椎動物 (たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など) 由来の細胞が用いられ、より好ましくは、哺乳動物 (例えば、単孔類、有袋類、貧齒類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、鯨類、齧歯類、ウサギ目など) 由来の細胞が用いられる。さらに好ましくは、霊長類 (たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト) 由来の細胞が用いられる。最も好ましくはヒト由来の細胞が用いられる。 40

【0027】

本発明が対象とする臓器はどのような臓器でもよく、また本発明が対象とする組織または細胞は、生物のどの臓器または器官に由来するものでもよい。本明細書において「臓器 50

」または「器官」とは、互換可能に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物（例えば、動物、植物）では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官としては、血管系に関連する臓器または器官が挙げられる。1つの実施形態では、本発明が対象とする臓器は、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、膵膵、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、四肢末梢、網膜などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、本発明の多能性細胞から分化した細胞としては、表皮細胞、脾実質細胞、脾管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられるがそれらに限定されない。

10

【0028】

本明細書において「組織」(tissue)とは、多細胞生物において、実質的に同一の機能および/または形態をもつ細胞集団をいう。通常「組織」は、同じ起源を有するが、異なる起源を持つ細胞集団であっても、同一の機能および/または形態を有するのであれば、組織と呼ばれ得る。従って、本発明の幹細胞を用いて組織を再生する場合、2以上の異なる起源を有する細胞集団が一つの組織を構成し得る。通常、組織は、臓器の一部を構成する。動物の組織は、形態的、機能的または発生的根拠に基づき、上皮組織、結合組織、筋肉組織、神経組織などに区別される。植物では、構成細胞の発達段階によって分裂組織と永久組織とに大別され、また構成細胞の種類によって単一組織と複合組織とに分けるなど、いろいろな分類が行われている。

20

【0029】

本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプチド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。

30

【0030】

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピ

40

50

ルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る（B a t z e r et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); O h t s u k a et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); R o s s o l i n i et al., Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)）。

【0031】

用語「核酸分子」もまた、本明細書において、核酸、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換可能に使用され、cDNA、mRNA、ゲノムDNAなどを含む。本明細書では、核酸および核酸分子は、用語「遺伝子」の概念に含まれ得る。ある遺伝子配列をコードする核酸分子はまた、「スプライス変異体（改変体）」を包含する。同様に、核酸によりコードされた特定のタンパク質は、その核酸のスプライス改変体によりコードされる任意のタンパク質を包含する。その名が示唆するように「スプライス変異体」は、遺伝子のオルタナティブスプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写物は、異なる（別の）核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプライスされ得る。スプライス変異体の産生機構は変化するが、エキソンのオルタナティブスプライシングを含む。読み越し転写により同じ核酸に由来する別のポリペプチドもまた、この定義に包含される。スプライシング反応の任意の産物（組換え形態のスプライス産物を含む）がこの定義に含まれる。したがって、本明細書では、たとえば、Stm1遺伝子には、Stm1のスプライス変異体もまた包含され得る。また本明細書においてStm1遺伝子と言う場合には、Stm1遺伝子領域の全てまたは一部を含む転写産物を包含する。

【0032】

本明細書において「複合分子」とは、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、脂質、糖などの分子が複数種連結してできた分子をいう。そのような複合分子としては、例えば、糖脂質、糖ペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書では、Stm遺伝子またはその産物と同様の機能を有する限り、そのような複合分子も使用することができる。

【0033】

本明細書において「単離された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子が天然に存在する生物体の細胞内の他の生物学的因子（例えば、核酸である場合、核酸以外の因子および目的とする核酸以外の核酸配列を含む核酸；タンパク質である場合、タンパク質以外の因子および目的とするタンパク質以外のアミノ酸配列を含むタンパク質など）から実質的に分離または精製されたものをいう。「単離された」核酸およびタンパク質には、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。したがって、単離された核酸およびタンパク質は、化学的に合成した核酸およびタンパク質を包含する。

【0034】

本明細書において「精製された」生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。したがって、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い（すなわち濃縮されている）。

【0035】

本明細書中で使用される用語「精製された」および「単離された」は、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が

存在することを意味する。

【0036】

本明細書において、「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定するものを構造遺伝子といい、その発現を左右するものを調節遺伝子（たとえば、プロモーター）という。本明細書では、遺伝子は、特に言及しない限り、構造遺伝子および調節遺伝子を包含する。したがって、S t m 遺伝子というときは、通常、S t m の構造遺伝子およびS t m のプロモーターの両方を包含する。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を指すことがある。本明細書においてはまた、「遺伝子産物」は、遺伝子によって発現された「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を包含する。当業者であれば、遺伝子産物が何たるかはその状況に応じて理解することができる。

【0037】

本明細書において遺伝子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、遺伝子（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ（同一）とみなした場合の、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて同一性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、同一性と類似性とは同じ数値を示す。

【0038】

本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。

【0039】

本明細書において、「アミノ酸」は、本発明の目的を満たす限り、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体アミノ酸」または「アミノ酸アナログ」とは、天然に存在するアミノ酸とは異なるがもとのアミノ酸と同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体アミノ酸およびアミノ酸アナログは、当該分野において周知である。

【0040】

用語「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のL-異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、 γ -カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体であるが、D体のアミノ酸を用いた形態もまた本発明の範囲内にある。

【0041】

用語「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラフルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD体またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および／または機能に

類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様な様式で機能する化合物をいう。

【0042】

アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言及され得る。

【0043】

本明細書において、「対応する」アミノ酸または核酸とは、それぞれあるポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子において、比較の基準となるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、あるいは有することが予測されるアミノ酸または核酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、あるポリヌクレオチドのアンチセンス分子であれば、そのアンチセンス分子の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。本明細書において、Stm2遺伝子とStm1遺伝子とは、相違する部分があるが、このような相違する部分は、他の種のStm2遺伝子とStm1遺伝子とにおいて対応するといえる。

【0044】

本明細書において、「対応する」遺伝子とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子の対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログあるいは種相同体であり得る。したがって、マウスStm遺伝子に対応する遺伝子は、他の動物においても見出すことができる。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。したがって、例えば、ある動物における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子（例えば、マウスStm1遺伝子）の配列をクエリ配列として用いてその動物（例えばヒト、ラット）の配列データベースを検索することによって見出すことができる。

【0045】

本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。「誘導体ヌクレオチド」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログは、当該分野において周知である。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)が含まれるが、これらに限定されない。

【0046】

本明細書において、「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さがn）に対して、1～n-1までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数

は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または加減としての上述の個数は、その個数の上下数個（または例えば上下10%）のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。

【0047】

本明細書において「Stm」または「Stm遺伝子」とは、Stm1遺伝子のDNA塩基配列との比較により何らかの相同性が見いだされる遺伝子全てを示す。遺伝子発現が見られるものでは、未分化細胞、初期胚もしくは生殖細胞のいずれかまたはいくつかの細胞において発現する。そのようなStm遺伝子としては、例えば、

(A) (a) 配列番号1、3、5、7、9または29に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2、4、6、8、10または30に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号2、4、6、8、10または30に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号1、3、5、7、9または29に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号2、4、6、8、10または30に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

を含む、

核酸分子；あるいは

(B) (a) 配列番号2、4、6、8、10または30に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

(b) 配列番号2、4、6、8、10または30に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号1、3、5、7、9または29に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

(d) 配列番号2、4、6、8、10または30に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

(e) (a)～(d)のいずれか1つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、

を含む、
ポリペプチドをコードする核酸分子が挙げられるがそれらに限定されない。Stm遺伝子は好ましくは、

(A) (a) 配列番号1、3、5または29に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2、4、6または30に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号2、4、6または30に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改

10

20

30

40

50

変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 1、3、5 または 29 に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 2、4、6 または 30 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも 70% である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
を含む、
核酸分子：あるいは

(B) (a) 配列番号 2、4、6 または 30 に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 2、4、6 または 30 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 1、3、5 または 29 に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

(d) 配列番号 2、4、6 または 30 に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

(e) (a) ~ (d) のいずれか 1 つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも 70% であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、
を含む、
ポリペプチドをコードする核酸分子が挙げられるがそれらに限定されない。

【0048】

Stm 遺伝子は、Stm1 遺伝子、Stm2 遺伝子、Stm3 遺伝子、Stm4 遺伝子を含む。本明細書において特に区別するとき、遺伝子は斜字体で記載し、マウスのものは Stm、ヒトのものは STM と標記するが、通常は特定の種を意味しない。他方、タンパク質は斜字体ではない STM と示して区別することがあるが、通常は特定の種を意味しない。

【0049】

本明細書において「Stm1」および「Stm1 遺伝子」とは、配列番号 1、3、5 または 29 に記載される核酸配列または配列番号 2、4、6 または 30 に記載されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む遺伝子ならびにそれに対応する遺伝子（種相同体を含む）をいう。Stm1 のその遺伝子産物を特定するためには、好ましくは、全長アミノ酸配列を含むポリペプチドに対して作製した特異的な抗体を用いる。Stm1 遺伝子は、Nanog と呼ばれる遺伝子と同一であることがわかっている。

【0050】

本明細書において「Stm2」および「Stm2 遺伝子」とは、配列番号 7 または 9 に記載される核酸配列または配列番号 8 または 10 に記載されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む遺伝子ならびにそれに対応する遺伝子（種相同体を含む）をいう。マウス Stm2 は Stm1 に対して mRNA のコーディング領域の塩基配列が 99.6% 相同性のある遺伝子である。しかし、Stm2 遺伝子はイントロンレスのシングルエクソンからなる遺伝子構造をもち、4 個のエクソンと 3 個のイントロンをもつ Stm1 とは構造が異なる上、Stm1 と Stm2 は異なる染色体上に位置することが解っている。本発明によって、Stm2 は、マウス 7 番染色体 7E3 に位置することが明らかになった。なお、Stm1 と Stm2 とは、マウスの場合 99.6% の相同性を有する。

19

20

30

40

50

【0051】

Stm1とStm2との決定的な相違は、細胞における発現の有無である。Stm1は発現される遺伝子であるのに対し、Stm2は、通常の細胞では発現されず、偽遺伝子であることが判明している。

【0052】

本明細書において、「STM」、「STMタンパク質」、「STM1」、「STM1タンパク質」、「STM2」、「STM2タンパク質」という表現は、それぞれの遺伝子（Stm、Stm1、Stm2など）のタンパク質形態を示すために使用される。

【0053】

本明細書において「未分化状態に特異的なマーカーのプロモーター」とは、細胞の未分化状態において、他の少なくとも1つの状態よりも多く発現を促進することの特徴とするプロモーターをいう。このような未分化状態に特異的なマーカーとして、Stm1、Oct3/4、Ulf-1、Rex1、Sox2、Fbx15などが挙げられるがそれらに限定されない。Oct3/4では、組織特異的なエンハンサー（proximal enhancer、distal enhancer）の存在が知られ、本来の発現パターンを反映させようとする場合には、そのようなエンハンサーの存在を考慮する必要がある。このためには、10kbp以上の配列が必要となることがあり、そのために、Bacクロンなどでは、10kbp以上必要となることから、Oct3/4のプロモーターを利用するよりは、本発明の好ましい実施形態であるStm1のプロモーターを利用することがはるかに有利であり得る。

【0054】

本明細書において、「Stm1のプロモーター配列」は、Stm1遺伝子に関連するプロモーター配列をいう。そのような配列は、配列番号34（マウス）またはそれに対応する配列などが挙げられるがそれらに限定されない。Stm1遺伝子の発現制御には、転写開始点から上流390bpがあることが好ましく、その塩基配列としては、配列番号31（ヒト）、32（マウス）、33（カニクイサル）に示される配列などが挙げられる。その中でも、Oct/Sox（転写開始点を起点とすれば-180位~-166位、TTT TGCAT TACAATG（Oct/Soxモチーフ配列；ここで、TTT TGCATは、Octモチーフ配列であり、TACAATGはSoxモチーフ配列である））がモチーフとなることが、塩基配列置換の実験から明らかになった。

【0055】

本明細書において「外来遺伝子」とは、ある生物において、その生物には天然には存在しない遺伝子をいう。そのような外来遺伝子は、その生物に天然に存在する遺伝子を改変したものであってもよく、天然において他の生物に存在する遺伝子（例えば、Stm1遺伝子）であってよく、人工的に合成した遺伝子であってよく、それらの複合体（例えば、融合体）であってよい。そのような外来遺伝子を含む生物は、天然では発現しない遺伝子産物を発現し得る。

【0056】

本明細書において使用される「サイトカイン」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、細胞から産生され同じまたは異なる細胞に作用する生理活性物質をいう。サイトカインは、一般にタンパク質またはポリペプチドであり、免疫応答の制御作用、内分泌系の調節、神経系の調節、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、細胞増殖の調節作用、細胞分化の調節作用などを有する。本明細書では、サイトカインはタンパク質形態または核酸形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。本明細書において用いられる「増殖因子」とは、細胞の増殖を促進または制御する物質をいう。増殖因子は、成長因子または発育因子ともいわれる。増殖因子は、細胞培養または組織培養において、培地に添加されて血清高分子物質の作用を代替し得る。多くの増殖因子は、細胞の増殖以外に、分化状態の制御因子としても機能することが判明している。サイトカインには、代表的には、インターロイキン類、ケモカイン類、コロニー刺激因子のような造血因子、腫瘍壊死因子、インター

フェロン類が含まれる。増殖因子としては、代表的には、血小板由来増殖因子（PDGF）、上皮増殖因子（EGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、肝実質細胞増殖因子（HGF）、血管内皮増殖因子（VEGF）のような増殖活性を有するものが挙げられる。

【0057】

本発明において、発現されるべき外来遺伝子は、上述の天然型の外来遺伝子と相同性のあるものが使用され得る。そのような相同性を有する外来遺伝子としては、例えば、Blastのデフォルトパラメータを用いて比較した場合に、比較対照の外来遺伝子に対して、少なくとも約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%の同一性または類似性を有する核酸配列を含む核酸分子または少なくとも約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド分子が挙げられるがそれらに限定されない。

【0058】

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど遺伝子産物の「発現」とは、その遺伝子などがインビボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてmRNAが作製されることもまた発現の一形態であり得る。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。

【0059】

従って、本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「減少」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に減少することをいう。好ましくは、発現の減少は、ポリペプチドの発現量の減少を含む。本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」の「増加」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に増加することをいう。好ましくは、発現の増加は、ポリペプチドの発現量の増加を含む。本明細書において遺伝子の「発現」の「誘導」とは、ある細胞にある因子を作用させてその遺伝子の発現量を増加させることをいう。したがって、発現の誘導は、まったくその遺伝子の発現が見られなかった場合にその遺伝子が発現するようにすること、およびすでにその遺伝子の発現が見られていた場合にその遺伝子の発現が増大することを包含する。

【0060】

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリペプチドまたはタンパク質）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含される。例えば、ある因子がアンチセンス分子である場合、その生物学的活性は、対象となる核酸分子への結合、それによる発現抑制などを包含する。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。

【0061】

本明細書において「アンチセンス（活性）」とは、標的遺伝子の発現を特異的に抑制または低減することができる活性をいう。アンチセンス活性は、通常、目的とする遺伝子（例えば、Stm）の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列によって達成される。このようなアンチセンス活性を有する分子をアンチセンス分子という。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌク

レオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。そのような核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、もっとも好ましくは95%相同な核酸配列が含まれる。そのようなアンチセンス活性は、目的とする遺伝子の核酸配列の5'末端の配列に対して相補的であることが好ましい。そのようなアンチセンスの核酸配列には、上述の配列に対して、1つまたは数個あるいは1つ以上のヌクレオチドの置換、付加および/または欠失を有するものもまた含まれる。

【0062】

本明細書において「RNAi」とは、RNA interferenceの略称で、二本鎖RNA (dsRNAともいう) のようなRNAiを引き起こす因子を細胞に導入することにより、相同なmRNAが特異的に分解され、遺伝子産物の合成が抑制される現象およびそれに用いられる技術をいう。本明細書においてRNAiはまた、場合によっては、RNAiを引き起こす因子と同義に用いられ得る。

【0063】

本明細書において「RNAiを引き起こす因子」とは、RNAiを引き起こすことができるような任意の因子をいう。本明細書において「遺伝子」に対して「RNAiを引き起こす因子」とは、その遺伝子に関するRNAiを引き起こし、RNAiがもたらす効果（例えば、その遺伝子の発現抑制など）が達成されることをいう。そのようなRNAiを引き起こす因子としては、例えば、標的遺伝子の核酸配列の一部に対して少なくとも約70%の相同性を有する配列またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含む、少なくとも10ヌクレオチド長の二本鎖部分を含むRNAまたはその改変体が挙げられるがそれに限定されない。ここで、この因子は、好ましくは、3'突出末端を含み、より好ましくは、3'突出末端は、2ヌクレオチド長以上のDNA（例えば、2~4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

【0064】

理論に束縛されないが、RNAiが働く機構として考えられるものの一つとして、dsRNAのようなRNAiを引き起こす分子が細胞に導入されると、比較的長い（例えば、40塩基対以上）RNAの場合、ヘリカーゼドメインを持つダイサー（Dicer）と呼ばれるRNase III様のヌクレアーゼがATP存在下で、その分子を3'末端から約20塩基対ずつ切り出し、短鎖dsRNA（siRNAとも呼ばれる）を生じる。本明細書において「siRNA」とは、short interfering RNAの略称であり、人工的に化学合成されるかまたは生化学的に合成されたものか、あるいは生物体内で合成されたものか、あるいは約40塩基以上の二本鎖RNAが体内で分解されてできた10塩基対以上の短鎖二本鎖RNAをいい、通常、5'-リン酸、3'-OHの構造を有しており、3'末端は約2塩基突出している。このsiRNAに特異的なタンパク質が結合して、RISC（RNA-induced silencing complex）が形成される。この複合体は、siRNAと同じ配列を有するmRNAを認識して結合し、RNase III様の酵素活性によってsiRNAの中央部でmRNAを切断する。siRNAの配列と標的として切断するmRNAの配列の関係については、100%一致することが好ましい。しかし、siRNAの中央から外れた位置についての塩基の変異については、完全にRNAiによる切断活性がなくなるのではなく、部分的な活性が残存する。他方、siRNAの中央部の塩基の変異は影響が大きく、RNAiによるmRNAの切断活性が極度に低下する。このような性質を利用して、変異をもつmRNAについては、その変異を中央に配したsiRNAを合成し、細胞内に導入することで特異的に変異を含むmRNAだけを分解することができる。従って、本発明では、siRNAそのものをRNAiを引き起こす因子として用いることができるし、siRNAを生成するような因子（例えば、代表的に約40塩基以上のdsRNA）をそのような因子として用いることができる。

【0065】

また、理論に束縛されることを希望しないが、*siRNA*は、上記経路とは別に、*siRNA*のアンチセンス鎖が*mRNA*に結合して*RNA*依存性*RNA*ポリメラーゼ (*RdRP*) のプライマーとして作用し、*dsRNA*が合成され、この*dsRNA*が再びダイサーの基質となり、新たな*siRNA*を生じて作用を増幅することも企図される。従って、本発明では、*siRNA*自体および*siRNA*が生じるような因子もまた、有用である。実際に、昆虫などでは、例えば35分子の*dsRNA*分子が、1,000コピー以上ある細胞内の*mRNA*をほぼ完全に分解することから、*siRNA*自体および*siRNA*が生じるような因子が有用であることが理解される。

【0066】

本発明において*siRNA*と呼ばれる、約20塩基前後（例えば、代表的には約21～23塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖*RNA*を用いることができる。このような*siRNA*は、細胞に発現させることにより遺伝子発現を抑制し、その*siRNA*の標的となる病原遺伝子の発現を抑えることから、疾患の治療、予防、予後などに使用することができる。

【0067】

本発明において用いられる*siRNA*は、*RNAi*を引き起こすことができる限り、どのような形態を採っていてもよい。

【0068】

別の実施形態において、本発明の*RNAi*を引き起こす因子は、3'末端に突出部を有する短いヘアピン構造 (*shRNA*; *short hairpin RNA*) であり得る。本明細書において「*shRNA*」とは、一本鎖*RNA*で部分的に回文状の塩基配列を含むことにより、分子内で二本鎖構造をとり、ヘアピンのような構造となる約20塩基対以上の分子をいう。そのような*shRNA*は、人工的に化学合成される。あるいは、そのような*shRNA*は、センス鎖およびアンチセンス鎖の*DNA*配列を逆向きに連結したヘアピン構造の*DNA*を*T7 RNA*ポリメラーゼによりインビトロで*RNA*を合成することによって生成することができる。理論に束縛されることは希望しないが、そのような*shRNA*は、細胞内に導入された後、細胞内で約20塩基（代表的には例えば、21塩基、22塩基、23塩基）の長さに分解され、*siRNA*と同様に*RNAi*を引き起こし、本発明の処置効果があることが理解されるべきである。このような効果は、昆虫、植物、動物（哺乳動物を含む）など広汎な生物において発揮されることが理解されるべきである。このように、*shRNA*は、*siRNA*と同様に*RNAi*を引き起こすことから、本発明の有効成分として用いることができる。*shRNA*はまた、好ましくは、3'突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約10ヌクレオチド長以上、より好ましくは約20ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3'突出末端は、好ましくは*DNA*であり得、より好ましくは少なくとも2ヌクレオチド長以上の*DNA*であり得、さらに好ましくは2～4ヌクレオチド長の*DNA*であり得る。

【0069】

本発明において用いられる*RNAi*を引き起こす因子は、人工的に合成した（例えば、化学的または生化学的）ものでも、天然に存在するものでも用いることができ、この両者の間で本発明の効果に本質的な違いは生じない。化学的に合成したものでは、液体クロマトグラフィーなどにより精製をすることが好ましい。

【0070】

本発明において用いられる*RNAi*を引き起こす因子は、インビトロで合成することもできる。この合成系において、*T7 RNA*ポリメラーゼおよび*T7*プロモーターを用いて、鋳型*DNA*からアンチセンスおよびセンスの*RNA*を合成する。これらをインビトロでアニーリングした後、細胞に導入すると、上述のような機構を通じて*RNAi*が引き起こされ、本発明の効果が達成される。ここでは、例えば、リン酸カルシウム法でそのような*RNA*を細胞内に導入することができる。

【0071】

本発明の*RNAi*を引き起こす因子としてはまた、*mRNA*とハイブリダイズし得る—

本鎖、あるいはそれらのすべての類似の核酸アナログのような因子も挙げられる。そのような因子もまた、本発明の処置方法および組成物において有用である。

【0072】

本明細書において、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムである) を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。20
「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、本発明で具体的に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0073】

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび/またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の対象となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれ限定されない。30

【0074】

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相同なまたは相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。40
プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。

【0075】

本明細書において、「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および/または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990))、FASTA (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:2444-2448 (1988))、Smith and Waterman 50

法 (Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147:195-197 (1981))、および Needleman and Wunsch 法 (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970)) などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノム DNA をナイロンメンブレン等に貼り付けたマクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ (マイクロアレイアッセイ)、PCR および *in situ* ハイブリダイゼーションなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0076】

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子 (例えば、DNA または RNA など) が用いられ得る。

【0077】

通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも 8 の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも 9 の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは 10 の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは 11 の連続するヌクレオチド長の、12 の連続するヌクレオチド長の、13 の連続するヌクレオチド長の、14 の連続するヌクレオチド長の、15 の連続するヌクレオチド長の、16 の連続するヌクレオチド長の、17 の連続するヌクレオチド長の、18 の連続するヌクレオチド長の、19 の連続するヌクレオチド長の、20 の連続するヌクレオチド長の、25 の連続するヌクレオチド長の、30 の連続するヌクレオチド長の、40 の連続するヌクレオチド長の、50 の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも 70 % 相同な、より好ましくは、少なくとも 80 % 相同な、さらに好ましくは、90 % 相同な、95 % 相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成 (増幅) が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム (例えば、LASERGENE, Primer Select, DNASTAR) を用いて行ってもよい。

【0078】

本明細書において、「エピトープ」とは、抗原決定基をいう。従って、エピトープには特定の免疫グロブリンによる認識に関与するアミノ酸残基のセット、または、T 細胞の場合は、T 細胞レセプタータンパク質および/もしくは主要組織適合性複合体 (MHC) レセプターによる認識について必要であるアミノ酸残基のセットが含まれる。この用語はまた、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と交換可能に使用される。免疫系分野において、インビボまたはインビトロで、エピトープは、分子の特徴 (例えば、一次ペプチド構造、二次ペプチド構造または三次ペプチド構造および電荷) であり、免疫グロブリン、T 細胞レセプターまたは HLA 分子によって認識される部位を形成する。ペプチドを含むエピトープは、エピトープに独特な空間的コンフォメーション中に 3 つ以上のアミノ酸を含み得る。一般に、エピトープは、少なくとも 5 つのこのようなアミノ酸からなり、代表的には少なくとも 6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、または 10 のこのようなアミノ酸からなる。エピトープの長さは、より長いほど、もとのペプチドの抗原性に類似することから一般的に好ましいが、コンフォメーションを考慮すると、必ずしもそうでないことがある。アミノ酸の空間的コンフォメーションを決定する方法は、当該分野で公知であり、例えば、X 線結晶学、および 2 次元核磁気共鳴分光法を含む。さらに、所定のタンパク質におけるエピトープの同定は、当該分野で周知の技術を使用して容易に達成される。例えば、Geyssen ら (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998 (所定の抗原における免疫原性エピトープの位置を決定するために迅速にペプチドを合成

する一般的な方法) : 米国特許第 4, 708, 871 号 (抗原のエピトープを同定し、そして化学的に合成するための手順) ; および Geysen ら (1986) *Molecular Immunology* 23:709 (所定の抗体に対して高い親和性を有するペプチドを同定するための技術) を参照されたい。同じエピトープを認識する抗体は、単純な免疫アッセイにおいて同定され得る。このように、ペプチドを含むエピトープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピトープは、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができる。

【0079】

従って、ペプチドを含むエピトープとして使用するためには、少なくとも 3 アミノ酸の長さの配列が必要であり、好ましくは、この配列は、少なくとも 4 アミノ酸、より好ましくは 5 アミノ酸、6 アミノ酸、7 アミノ酸、8 アミノ酸、9 アミノ酸、10 アミノ酸、15 アミノ酸、20 アミノ酸、25 アミノ酸の長さの配列が必要であり得る。

【0080】

本明細書においてある核酸分子またはポリペプチドに「特異的に結合する因子」とは、その核酸分子またはポリペプチドに対するその因子の結合レベルが、その核酸分子またはポリペプチド以外の核酸分子またはポリペプチドに対するその因子の結合レベルと同じかまたはそれよりも高い因子をいう。そのような因子としては、例えば、対象が核酸分子の場合、対象となる核酸分子に対して相補的な配列を有する核酸分子、対象となる核酸配列に対して結合するポリペプチド (例えば、転写因子など) などが挙げられ、対象がポリペプチドの場合、抗体、単鎖抗体、レセプター-リガンドの対のいずれか一方、酵素-基質のいずれか一方などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0081】

本明細書において用いられる用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、および抗イデオタイプ抗体、ならびにそれらの断片、例えば F (a b')₂ および F a b 断片、ならびにその他の組換えにより生産された結合体を含む。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α ガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。

【0082】

本明細書中で使用される用語「モノクローナル抗体」は、同質な抗体集団を有する抗体組成物をいう。この用語は、それが作製される様式によって限定されない。この用語は、全免疫グロブリン分子ならびに F a b 分子、F (a b')₂ フラグメント、F v フラグメント、およびもとのモノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示す他の分子を含む。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する方法は当該分野で公知であり、そして以下でより十分に記載される。

【0083】

モノクローナル抗体は、当該分野で周知の標準的な技術 (例えば、Kohler および Milstein, *Nature* (1975) 256:495) またはその改変 (例えば、Buck ら (1982) *In Vitro* 18:377) を使用して調製される。代表的には、マウスまたはラットを、タンパク質キャリアに結合したタンパク質で免疫化し、追加免疫し、そして脾臓 (および必要に応じていくつかの大きなリンパ節) を取り出し、そして単一細胞を解離する。必要に応じて、この脾臓細胞は、非特異的接着細胞の除去後、抗原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を適用することにより、スクリーニングされ得る。抗原に特異的なイムノグロブリンを発現する B 細胞がプレートに結合し、そして懸濁液の残渣でもリンス除去されない。次いで、得られた B 細胞 (すなわちすべての剥離した脾臓細胞) をミエローマ細胞と融合させて、ハイブリドーマを得、このハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を産生させる。

【0084】

本明細書において「抗原」 (antigen) とは、抗体分子によって特異的に結合さ

れ得る任意の基質をいう。本明細書において「免疫原」(immunogen)とは、抗原特異的免疫応答を生じるリンパ球活性化を開始し得る抗原をいう。

【0085】

あるタンパク質分子において、配列に含まれるあるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

【0086】

(遺伝子の改変)

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている(Kyte, JおよびDoolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157 (1): 105-132, 1982)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子(例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など)との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは：イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン/シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；スレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リジン(-3.9)；およびアルギニン(-4.5)である。

【0087】

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質(例えば、酵素活性において等価なタンパク質)を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。

【0088】

親水性指数もまた、ポリペプチドの設計において考慮され得る。米国特許第4,554,101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン(+3.0)；リジン(+3.0)；アスパラギン酸(+3.0±1)；グルタミン酸(+3.0±1)；セリン(+0.3)；アスパラギン(+0.2)；グルタミン(+0.2)；グリシン(0)；スレオニン(-0.4)；プロリン(-0.5±1)；アラニン(-0.5)；ヒスチジン(-0.5)；システイン(-1.0)；メチオニン(-1.3)；バリン(-1.5)；ロイシン(-1.8)；イソロイシン(-1.8)；チロシン(-2.3)；フェニルアラニン(-2.5)；およびトリプトファン(-3.4)。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。

【0089】

本発明において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または／および疎水性指数が上記のように類似している置換

をいう。保存的置換の例としては、例えば、親水性指数または疎水性指数が、 ± 2 以内のもの同士、好ましくは ± 1 以内のもの同士、より好ましくは ± 0.5 以内のもの同士のものが挙げられるがそれらに限定されない。従って、保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。

【0090】

本明細書において、「改変体」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの物質に対して、一部が変更されているものをいう。そのような改変体としては、置換改変体、付加改変体、欠失改変体、短縮 (truncated) 改変体、対立遺伝子変異体などが挙げられる。対立遺伝子 (allele) とは、同一遺伝子座に属し、互いに区別される遺伝的改変体のことをいう。従って、「対立遺伝子変異体」とは、ある遺伝子に対して、対立遺伝子の関係にある改変体をいう。そのような対立遺伝子変異体は、通常その対応する対立遺伝子と同一または非常に類似性の高い配列を有し、通常はほぼ同一の生物学的活性を有するが、まれに異なる生物学的活性を有することもある。「種相同体またはホモログ (homolog)」とは、ある種の中で、ある遺伝子とアミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで、相同性 (好ましくは、60%以上の相同性、より好ましくは、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上の相同性) を有するものをいう。そのような種相同体を取得する方法は、本明細書の記載から明らかである。「オルソログ (ortholog)」とは、オルソログ遺伝子 (orthologous gene) ともいい、二つの遺伝子がある共通祖先からの種分化に由来する遺伝子をいう。例えば、多重遺伝子構造をもつヘモグロビン遺伝子ファミリーを例にとると、ヒトおよびマウスの α ヘモグロビン遺伝子はオルソログであるが、ヒトの α ヘモグロビン遺伝子および β ヘモグロビン遺伝子はパラログ (遺伝子重複で生じた遺伝子) である。オルソログは、分子系統樹の推定に有用である。オルソログは、通常別の種においてもとの種と同様の機能を果たしていることがあり得ることから、本発明のオルソログもまた、本発明において有用であり得る。

【0091】

「保存的 (に改変された) 改変体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に改変された改変体とは、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸をいい、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列をいう。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一な核酸が任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドン GCA、GCC、GCG、および GCU はすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードされたポリペプチドを変更することなく、記載された対応するコドンの任意のものに変更され得る。このような核酸の変動は、保存的に改変された変異の1つの種である「サイレント改変 (変異)」である。ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列はまた、その核酸の可能なすべてのサイレント変異を記載する。当該分野において、核酸中の各コドン (通常メチオニンのための唯一のコドンである AUG、および通常トリプトファンのための唯一のコドンである TGG を除く) が、機能的に同一な分子を産生するために改変され得ることが理解される。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列において暗黙に含まれる。好ましくは、そのような改変は、ポリペプチドの高次構造に多大な影響を与えるアミノ酸であるシステインの置換を回避するようになされ得る。このような塩基配列の改変法としては、制限酵素などによる切断、DNAポリメラーゼ、Klenowフラグメント、DNAリガーゼなどによる処理等による連結等の処理、合成オリゴヌクレオチドなどを用いた部位特異的塩基置換法 (特定部位指向突然変異法; Mark Zoller and Michael Smith, *Methods in Enzymology*, 100, 468-500 (1983)) が挙げられるが、この他にも通常分子生物学の分野で用いられる方法によって改変を行うこともできる。本明細書では、好ましくは

、この保存的置換は、S t m 1 遺伝子と S t m 2 遺伝子との間で共通する部分の置換であることが有利であり得る。保存的置換があったとしても S t m 1 遺伝子と S t m 2 遺伝子とを識別することがなおも可能であるからである。

【0092】

本明細書中において、機能的に等価なポリペプチドを作製するために、アミノ酸の置換のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた行うことができる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

【0093】

本明細書において使用される用語「ペプチドアナログ」または「ペプチド誘導体」とは、ペプチドとは異なる化合物であるが、ペプチドと少なくとも1つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ペプチドアナログには、もとのペプチドに対して、1つ以上のアミノ酸アナログまたはアミノ酸誘導体が付加または置換されているものが含まれる。ペプチドアナログは、その機能が、もとのペプチドの機能（例えば、pKa値が類似していること、官能基が類似していること、他の分子との結合様式が類似していること、水溶性が類似していることなど）と実質的に同様であるように、このような付加または置換がされている。そのようなペプチドアナログは、当該分野において周知の技術を用いて作製することができる。したがって、ペプチドアナログは、アミノ酸アナログを含むポリマーであり得る。

【0094】

同様に、「ポリヌクレオチドアナログ」、「核酸アナログ」は、ポリヌクレオチドまたは核酸とは異なる化合物であるが、ポリヌクレオチドまたは核酸と少なくとも1つの化学的機能または生物学的機能が等価であるものをいう。したがって、ポリヌクレオチドアナログまたは核酸アナログには、もとのペプチドに対して、1つ以上のヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体が付加または置換されているものが含まれる。

【0095】

本明細書において使用される核酸分子は、発現されるポリペプチドが天然型のポリペプチドと実質的に同一の活性を有する限り、上述のようにその核酸の配列の一部が欠失または他の塩基により置換されていてもよく、あるいは他の核酸配列が一部挿入されていてもよい。あるいは、5'末端および/または3'末端に他の核酸が結合していてもよい。また、ポリペプチドをコードする遺伝子をストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、そのポリペプチドと実質的に同一の機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子でもよい。このような遺伝子は、当該分野において公知であり、本発明において利用することができる。

【0096】

このような核酸は、周知のPCR法により得ることができ、化学的に合成することもできる。これらの方法に、例えば、部位特異的変位誘発法、ハイブリダイゼーション法などを組み合わせてもよい。

【0097】

本明細書において、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「置換、付加または欠失」とは、もとのポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、それぞれアミノ酸もしくはその代替物、またはヌクレオチドもしくはその代替物が、置き換わること、付け加わるこ

とまたは取り除かれることをいう。このような置換、付加または欠失の技術は、当該分野において周知であり、そのような技術の例としては、部位特異的変異誘発技術などが挙げられる。置換、付加または欠失は、1つ以上であれば任意の数でよく、そのような数は、その置換、付加または欠失を有する改変体において目的とする機能（例えば、ホルモン、サイトカインの情報伝達機能など）が保持される限り、多くすることができる。例えば、そのような数は、1または数個であり得、そして好ましくは、全体の長さの20%以内、10%以内、または100個以下、50個以下、25個以下などであり得る。

【0098】

本明細書において、遺伝子が「特異的に発現する」とは、その遺伝子が、植物の特定の部位または時期において他の部位または時期とは異なる（好ましくは高い）レベルで発現されることをいう。特異的に発現するとは、ある部位（特異的部位）にのみ発現してもよく、それ以外の部位においても発現していてもよい。好ましくは特異的に発現するとは、ある部位においてのみ発現することをいう。

【0099】

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Sambrook, J. et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Innis, M. A. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). *PCR Strategies*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

【0100】

人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えば、Gait, M. J. (1985). *Oligonucleotide Synt*

thesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim: Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

【0101】

本明細書において遺伝子について言及する場合、「ベクター」または「組み換えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体などの宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。ベクターのうち、クローニングに適したベクターを「クローニングベクター」という。そのようなクローニングベクターは通常、制限酵素部位を複数含むマルチブルクローニング部位を含む。現在、遺伝子のクローニングに使用可能なベクターは、当該分野において多数存在し、販売元により、微妙な違い（例えばマルチクローニングサイトの制限酵素の種類や配列）から名前を変えて販売されている。例えば、In "Molecular Cloning (3rd edition)" by Sambrook, J and Russell, D. W., Appendix 3 (Volume 3), Vectors and Bacterial strains. A3.2 (Cold Spring Harbor USA, 2001) に代表的なものが記載（発売元も記載）されており、そのようなものを当業者は適宜目的に応じて使用することができる。

【0102】

本明細書において「発現ベクター」とは、構造遺伝子およびその発現を調節するプロモーターに加えて種々の調節エレメントが宿主の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。調節エレメントは、好ましくは、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子のような選択マーカーおよび、エンハンサーを含み得る。生物（例えば、動物）の発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

【0103】

本明細書において使用される組み換えベクターとしては、例えば、ゲノムライブラリーのスクリーニングにはラムダFIXベクター（ファージベクター）を、cDNAのスクリーニングではラムダZAPベクター（ファージベクター）を利用することができる。ゲノムDNAのクローニングにはpBluescript II SK+/−, pGEM, pCR2.1ベクター（プラスミドベクター）を主に使用することができる。発現ベクターとしてpSV2neoベクター（プラスミドベクター）を利用することができる。このようなベクターは、前出のMolecular Cloning A3.2を参考にして適宜実施することができる。

【0104】

本明細書において「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に関与する

配列である。ターミネーターは、mRNAの安定性に関与して遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。

【0105】

本明細書において「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、通常RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。したがって、本明細書においてある遺伝子のプロモーターの働きを有する部分を「プロモーター部分」という。プロモーターの領域は、通常、推定タンパク質コード領域の第1エキソンの上流約2kbp以内の領域であることが多いので、DNA解析用ソフトウェアを用いてゲノム塩基配列中のタンパク質コード領域を予測すれば、プロモーター領域を推定することはできる。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子の上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。好ましくは、推定プロモーター領域は、第1エキソン翻訳開始点から上流約2kbp以内に存在する。

【0106】

本明細書において「エンハンサー」とは、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられる配列をいう。そのようなエンハンサーは当該分野において周知である。エンハンサーは複数個用いられ得るが1個用いられてもよいし、用いなくともよい。

【0107】

本明細書において「作動可能に連結された(る)」とは、所望の配列の発現(作動)がある転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

【0108】

本明細書において、核酸分子を細胞に導入する技術は、どのような技術でもよく、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなどが挙げられる。そのような核酸分子の導入技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A.ら編(1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY; Sambrook Jら(1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. およびその第三版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット分析のような本明細書に記載される方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

【0109】

また、ベクターの導入方法としては、細胞にDNAを導入する上述のような方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など(例えば、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法など)が挙げられる。

【0110】

「形質転換体」とは、形質転換によって作製された細胞などの生命体の全部または一部をいう。形質転換体としては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などが例示される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、形質転換組織、形質転換宿主などともいわれる。本発明において用いられる細胞は、形質転換体であってもよい。

【0111】

本発明において遺伝子操作などにおいて原核生物細胞が使用される場合、原核生物細胞としては、Escherichia属、Serratia属、Bacillus属、Brevibacterium属、Corynebacterium属、Microbacterium属、Pseudomonas属などに属する原核生物細胞、例えば、Esch

erichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1が例示され、そのような細胞は、In "Molecular Cloning (3rd edition)" by Sambrook, J and Russell, D. W., Appendix 3 (Volume 3), Vectors and Bacterial strains, A3.2 (Cold Spring Harbor USA 2001) に記載されている。

【0112】

本明細書において使用される場合、動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637（特開昭63-299）、ヒト結腸癌細胞株などを挙げることができる。マウス・ミエローマ細胞としては、ps20、NSOなど、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/Oなど、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293（ATCC：CRL-1573）など、ヒト白血病細胞としてはBALL-1など、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト結腸癌細胞株としてはHCT-15が例示され、好ましくは、例えば、Cos1、NIH3T3、ES（R1、TMA、NR2）細胞が挙げられるがそれらに限定されない。

【0113】

本明細書において使用される場合、組換えベクターの導入方法としては、DNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法[Methods, Enzymol., 194, 182 (1990)]、リポフェクション法、スフェロブラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法[J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法などが例示される。

【0114】

本明細書において使用されるゲノムまたは遺伝子座などを除去する方法において用いられる、Cre酵素の一過的発現、染色体上でのDNAマッピングなどは、細胞工学別冊実験プロトコルシリーズ「FISH実験プロトコル ヒト・ゲノム解析から染色体・遺伝子診断まで」松原謙一、吉川 寛 監修 秀潤社（東京）などに記載されるように、当該分野において周知である。

【0115】

本明細書において遺伝子発現（たとえば、mRNA発現、ポリペプチド発現）の「検出」または「定量」は、例えば、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。アレイ（例えば、DNAアレイ、プロテインアレイ）を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、（秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」）に広く概説されている。プロテインアレイについては、Nat Genet. 2002 Dec; 32 Suppl: 526-32に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、RT-PCR、RACE法、SSCP法、免疫沈降法、two-hybridシステム、インビトロ翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法 中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔 羊土社（2002）などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

【0116】

本明細書において「発現量」とは、目的の細胞などにおいて、ポリペプチドまたはmRNAが発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いてELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペプチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザンブロット法、ドットブロット法、PCR法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのmRNAレベルでの発現量が挙げられる。「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのタンパク質レベルまたはmRNAレベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。

【0117】

10

(ポリペプチドの製造方法)

本発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞などに由来する形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、本発明の培養物より本発明のポリペプチドを採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

【0118】

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、本発明の生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

20

【0119】

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する精蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類を用いることができる。

【0120】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸または有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素物質、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

30

【0121】

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。

【0122】

培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常5時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。また培養中必要に応じて、アンピシリンまたはテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

40

【0123】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。遺伝子を導入した植物の細胞または器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド、

50

スクーグ (MS) 培地、ホワイト (White) 培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

【0124】

例えば、動物細胞を用いる場合、本発明の細胞を培養する培地は、一般に使用されている RPMI 1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proceedings of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地にウシ胎児血清等を添加した培地等が用いられる。 10

【0125】

培養は、通常 pH 6~8、25~40℃、5% CO₂ 存在下等の条件下で 1~7 日間行う。また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列で形質転換された形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離または精製するためには、当該分野で周知慣用の通常の酵素の単離または精製法を用いることができる。例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞外に本発明のポリペプチドが分泌される場合には、その培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。その可溶性画分から 20、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) - Sepharose、DIAION HPA-75 (三菱化成) 等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia) 等の樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等の樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、その細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモジナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。その無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) - Sepharose、DIAION HPA-75 (三菱化成) 等樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia) 等の樹脂を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等の樹脂を用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用いることによって、精製標品を得ることができる。 30

【0126】

また、本発明のポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により本発明のポリペプチドを回収後、そのポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。この可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、本発明のポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。 40

【0127】

また、通常のタンパク質の精製方法 [J. Evan, Sadler ら: Methods in Enzymology, 83, 458] に準じて精製できる。また、本発明のポ 50

リペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる【山川彰夫, 実験医学 (Experimental Medicine), 13, 469-474 (1995)】。例えば、Loweらの方法【Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227-8231 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)】に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

【0128】

また、本発明のポリペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗 10
FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる【Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)】。

【0129】

さらに、本発明のポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラ 20
フィーで精製することもできる。本発明のポリペプチドは、公知の方法【J. Biomolecular NMR, 6, 129-134、Science, 242, 1162-1164、J. Biochem., 110, 166-168 (1991)】に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いて生産することができる。

【0130】

上記で取得されたポリペプチドのアミノ酸情報を基に、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法 20
によっても本発明のポリペプチドを製造することができる。また、Advanced ChemTech、Applied Biosystems、Pharmacia Biotech、Protein Technology Instrument、Synthecell-Vega、PerSeptive、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

【0131】

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、タンパク質化学で通常用いられる方法、 30
例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。本発明の新規ps20様ポリペプチドの生理活性は、公知の測定法【Cell, 75, 1389 (1993)、J. Cell Bio., 1146, 233 (1999)、Cancer Res., 58, 1238 (1998)、Neuron 17, 1157 (1996)、Science 289, 1197 (2000)】に準じて測定することができる。

【0132】

（変異型ポリペプチドの作製方法）

本発明ポリペプチドのアミノ酸の欠失、置換もしくは付加は、出願前周知技術である部 40
位特異的変異誘発法により実施することができる。かかる1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-38, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT WO85/00817 (1985)、Na 50

ture, 316, 601 (1985) 等に記載の方法に従って調製することができる。

【0133】

(免疫化学)

本発明のポリペプチドを認識する抗体の作製もまた当該分野において周知である。例えば、ポリクローナル抗体の作製は、取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明のタンパク質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することにより行うことができる。

【0134】

抗体を生産する場合、投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。その抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 μ gが好ましい。ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) またはウシチログロブリン等のキャリアタンパク質に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。その抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法 [酵素免疫測定法 (ELISA法) : 医学書院刊 1976年、Antibodies—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] 等で確認する。

【0135】

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、その血清より、周知技術を用いてポリクローナル抗体を分離、精製することができる。モノクローナル抗体の作製もまた当該分野において周知である。抗体産性細胞の調製のために、まず、免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として使用し、骨髓腫細胞との融合により、ハイブリドーマの作製を行う。その後、酵素免疫測定法になどより、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。このようにして得たハイブリドーマから産生されたモノクローナル抗体は種々の目的に使用することができる。

【0136】

このような抗体は、例えば、本発明のポリペプチドの免疫学的検出方法に使用することができ、本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの免疫学的検出法としては、マイクロタイプレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等を挙げることができる。

【0137】

また、本発明ポリペプチドの免疫学的定量方法にも使用することができる。本発明ポリペプチドの定量方法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエпитープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のタンパク質と本発明のタンパク質を認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等を挙げることができる。

【0138】

本発明ポリペプチドのmRNAの定量方法もまた、当該分野において周知である。例えば、本発明のポリヌクレオチドあるいはDNAより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法により、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現量をmRNAレベルで定量することができる。このような技術は、当該分野において周知であり、本明細書において列挙した文献にも記載されている。

【0139】

当該分野で公知の任意の方法によって、これらのポリヌクレオチドが得られ得、そしてこれらポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、決定され得る。例えば、抗体のヌクレオチド配列が公知である場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成さ

れたオリゴヌクレオチドからアセンブルされ得（例えば、Kutmeier et al., BioTechniques 17:242 (1994) に記載されるように）、これは、手短に言えば、抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、ならびに次いでPCRによるこの連結されたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

【0140】

抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源由来の核酸から作製することができる。ある抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成され得るか、あるいは適切な供給源（例えば、抗体cDNAライブラリーまたは抗体を発現する任意の組織もしくは細胞（例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞）から生成されたcDNAライブラリー、またはそれから単離された核酸（好ましくはポリA+RNA））から、例えば、抗体をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを同定するために、その配列の3'末端および5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するPCR増幅によって、またはその特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得ることができる。PCRによって作製された増幅された核酸は、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。

【0141】

一旦、抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該分野で周知の方法（例えば、組換えDNA技術、部位指向性変異誘発、PCRなど（例えば、Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubelら編、1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載の技術を参照のこと。これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される。））を用いて操作され、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および/または挿入を生成するように異なるアミノ酸配列を有する抗体を作製し得る。

【0142】

特定の実施形態において、重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域（CDR）の配列の同定のために、当該分野において周知の方法によって（例えば、配列超可変性の領域を決定するために、他の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の既知のアミノ酸配列と比較することによって）調べられ得る。慣用的な組換えDNA技術を用いて、1つ以上のCDRが、前述のようにフレームワーク領域内に（例えば、非ヒト抗体をヒト化するために、ヒトフレームワーク領域中に）挿入され得る。このフレームワーク領域は天然に存在し得るか、またはコンセンサスフレームワーク領域であり得、そして好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る（例えば、列挙したヒトフレームワーク領域については、Chothia et al., J. Mol. Biol. 278:457-479 (1998) を参照のこと）。好ましくは、フレームワーク領域およびCDRの組み合わせによって生成されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に議論されるように、1つ以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内で作製され得、そして好ましくは、そのアミノ酸置換は、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法は、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を生成するように、鎖内ジスルフィド結合に関与する1つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって、および当該分野の技術において包含される。

【0143】

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体などの非ヒト抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせることによって、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術 (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985)) が使用され得る。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、このような分子は、マウスmAbなどの非ヒトmAbおよびヒト免疫グロブリンの定常領域由来の可変領域を有する (例えば、ヒト化抗体)。

【0144】

10

単鎖抗体を製造する場合、単鎖抗体の産生に関する記載された公知の技術 (米国特許第4,946,778号: Bird, Science 242:423-42 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); および Ward et al., Nature 334:544-54 (1989)) が、利用され得る。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。E. coliにおける機能性Fvフラグメントのアセンブリのための技術もまた、使用され得る (Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988))。

【0145】

20

(抗体を産生する方法)

本発明の抗体は、抗体の合成のために当該分野で公知の任意の方法によって、化学合成によって、または、好ましくは、組換え発現技術によって産生され得る。

【0146】

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ (例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体) の組換え発現は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの部分 (好ましくは、重鎖または軽鎖の可変ドメインを含有する) をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えDNA技術によって生成され得る。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法としては、例えば、インビトロの組換えDNA技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域 (例えば、PCT公開 WO86/05807; PCT公開 WO89/01036; および米国特許第5,122,464号を参照のこと) をコードするヌクレオチド配列を含み得、そしてこの抗体の可変ドメインは、重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る。

30

40

【0147】

この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、次いで、このトランスフェクトされた細胞は、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または本発明の単鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳述されるように、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中に同時発現され得る。

50

【0148】

(スクリーニング)

本明細書において「スクリーニング」とは、目的とするある特定の性質をもつ生物または物質などの標的を、特定の操作／評価方法で多数を含む集団の中から選抜することをいう。スクリーニングのために、本発明の因子（例えば、抗体）、ポリペプチドまたは核酸分子を使用することができる。

【0149】

本明細書において、免疫反応を利用してスクリーニングを行うことを、「免疫表現型分類 (immunophenotyping)」ともいう。この場合、本発明の抗体または単鎖抗体は、細胞株および生物学的サンプルの免疫表現型分類のために利用され得る。本発明の遺伝子の転写産物・翻訳産物は、細胞特異的マーカーとして、あるいはより詳細には、特定の細胞型の分化および／または成熟の種々の段階で示差的に発現される細胞マーカーとして有用である。特異的エピトープ、またはエピトープの組み合わせに対して指向されるモノクローナル抗体は、マーカーを発現する細胞集団のスクリーニングを可能とする。種々の技術が、マーカーを発現する細胞集団をスクリーニングするために、モノクローナル抗体を用いて利用され得、そしてその技術には、抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いる磁気分離、固体マトリクス（すなわち、プレート）に付着した抗体を用いる「パニング (panning)」、ならびにフローサイトメトリーが挙げられる（例えば、米国特許第5,985,660号；および Morrison et al., Cell, 96:737-49 (1999) を参照）。

【0150】

これらの技術は、ヒト臍帯血において見出され得るような細胞増殖および／または分化を起こし得るかまたは未分化状態への改変処置を行ったような細胞集団のような、未分化の細胞（例えば、胚性幹細胞、組織幹細胞など）を含む細胞集団についてスクリーニングするために利用され得る。

【0151】

(遺伝子治療)

特定の実施形態において、抗体またはその機能的誘導体をコードする配列を含む核酸は、本発明のポリペプチドの異常な発現および／または活性に関連した疾患または障害を処置、阻害または予防するために、遺伝子治療の目的で投与される。遺伝子治療とは、発現されたか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

【0152】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法が、本発明に従って使用され得る。例示的な方法は、以下のとおりである。

【0153】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら, Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993)；WuおよびWu, Biotechnology 3:87-95 (1991)；Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993)；Mulligan, Science 260:926-932 (1993)；ならびにMorganおよびAnderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993)；May, TIBTECH 11(5):155-215 (1993)を参照のこと。遺伝子治療において使用される一般的に公知の組換えDNA技術は、Ausubelら(編), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)；およびKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)に記載される。

【0154】

(治療活性または予防活性の証明)

本発明の化合物または薬学的組成物は、好ましくは、ヒトでの使用の前にインビトロで、そして次いでインビボで、所望の治療活性または予防活性について試験される。例えば、化合物または薬学的組成物の、治療有用性または予防有用性を証明するためのインビトロアッセイとしては、細胞株または患者組織サンプルに対する化合物の効果は、当業者に公知である技術（細胞溶解アッセイが挙げられるがこれらに限定されない）を利用して決定され得る。本発明に従って、特定の化合物の投与が示されるか否かを決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、インビトロ細胞培養アッセイが挙げられ、このアッセイでは、患者組織サンプルが培養物において増殖し、そして化合物に曝されるか、そうでなければ化合物が投与され、そして、組織サンプルに対するそのような化合物の効果が観察される。

【0155】

(治療／予防のための投与および組成物)

本発明は、被験体への有効量の本発明の化合物または薬学的組成物の投与による処置、阻害および予防の方法を提供する。好ましい局面において、化合物は実質的に精製されたものであり得る（例えば、その効果を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質が実質的に存在しない状態が挙げられる）。被験体は好ましくは、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられるがこれらに限定されない動物であり、そして好ましくは哺乳動物であり、そして最も好ましくはヒトである。

【0156】

本発明の核酸分子またはポリペプチドが医薬として使用される場合、そのような組成物は、薬学的に受容可能なキャリアなどをさらに含み得る。本発明の医薬に含まれる薬学的に受容可能なキャリアとしては、当該分野において公知の任意の物質が挙げられる。

【0157】

そのような適切な処方材料または薬学的に受容可能なキャリアとしては、抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的アジュバントが挙げられるがこれらに限定されない。代表的には、本発明の医薬は、単離された多能性幹細胞、またはその改変体もしくは誘導体を、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに含む組成物の形態で投与される。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、非経口送達のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。

【0158】

本明細書で使用される受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、レシピエントに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸；アスコルビン酸、 α -トコフェロール；低分子量ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；モノサッカリド、ジサッカリドおよび他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；ならびに／あるいは非イオン性表面活性剤（例えば、Tween、プルロニック（pluronic）またはポリエチレングリコール（PEG））などが挙げられるがこれらに限定されない。

【0159】

例示の適切なキャリアとしては、中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水が挙げられる。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤（例えば、スクロース）を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および

賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、pH 7.0-8.5のTris緩衝剤またはpH 4.0-5.5の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。

【0160】

本発明の医薬は、経口的または非経口的に投与され得る。あるいは、本発明の医薬は、静脈内または皮下で投与され得る。全身投与されるとき、本発明において使用される医薬は、発熱物質を含まない、薬学的に受容可能な水溶液の形態であり得る。そのような薬学的に受容可能な組成物の調製は、pH、等張性、安定性などを考慮することにより、当業者は、容易に行うことができる。本明細書において、投与方法は、経口投与、非経口投与（例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、粘膜投与、直腸内投与、腔内投与、鼻部への局所投与、皮膚投与など）であり得る。そのような投与のための処方物は、任意の製剤形態で提供され得る。そのような製剤形態としては、例えば、液剤、注射剤、徐放剤が挙げられる。

【0161】

本発明の医薬は、必要に応じて生理学的に受容可能なキャリア、賦型剤または安定化剤（日本薬局方第14版、その追補またはその最新版、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Genaro, ed., Mack Publishing Company, 1990などを参照）と、所望の程度の純度を有する糖鎖組成物とを混合することによって、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態で調製され保存され得る。

【0162】

本発明の処置方法において使用される糖鎖組成物の量は、使用目的、対象疾患（種類、重症度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明の処置方法を被検体（または患者）に対して施す頻度もまた、使用目的、対象疾患（種類、重症度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。頻度としては、例えば、毎日数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回-1ヶ月に1回）の投与が挙げられる。1週間-1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

【0163】

（再プログラム化）

本明細書において「再プログラム化」とは、細胞（たとえば、体細胞）に作用して、その細胞を未分化状にさせ、多能性を増加または獲得させることをいう。従って、再プログラムの活性は、ある因子を、分化した細胞（たとえば、体細胞）に、測定すべき量を一定時間（例えば、数時間など）暴露させた後に、多能性を測定し、暴露前のその細胞の多能性と比較して、有意な差異が見出されるかどうかを判定することによって測定される。再プログラムのレベルは、種々存在し、再プログラム化された細胞の多能性のレベルに対応する。したがって、全能性の幹細胞由来の再プログラム化因子を用いる場合には、再プログラム化は全能性に対応することがあり得る。したがって、再プログラム化状態は、本明細書において、未分化状態とほぼ1:1の関係にある。

【0164】

本明細書において、「再プログラム化因子」または「再プログラム化する因子」とは、細胞に作用し、その細胞を未分化細胞化する因子である。胚性幹細胞は体細胞核のインプリントを再プログラム化することはできないが、生殖細胞の発達は可能とするよう、体細胞核のエピジェネティクス状態を再プログラム化した。従って、胚性幹細胞中にそのような再プログラム化因子が含まれることは明らかである。また、胚性幹細胞以外の他の幹細胞にも体細胞を再プログラム化する因子がある可能性があり、本発明の再プログラム化因子はまたこれらの因子をも包含する。体細胞に作用させる胚性幹細胞由来の成分としては、胚性幹細胞中に含まれる成分であれば特に限定されないが、細胞質成分、核成分等、また個々のRNAおよびタンパク質等が挙げられる。雑多な分子を含む細胞質成分または核成分を作用させる場合、慣用な手段により（例えば、クロマトグラフィー等）ある程度の

分画を行い、分画された各画分を体細胞に対して作用させても良い。特定の画分が再プログラム化因子を含むことが判明した場合には、該画分をさらに精製し、最終的には一つの分子として特定し、それを利用することもできる。また代わりに、この再プログラム化因子が含まれる画分をそのまま、何ら精製することなく体細胞の再プログラム化に用いることも可能である。また、再プログラム化因子は、一分子が単独でそのような作用を示す場合も考え得るが、複数の分子が相互作用により、体細胞を未分化様細胞へと変化させることも考えられる。従って、本発明の「再プログラム化因子」には、単一分子からなる因子、複数分子からなる因子、および、前記単一分子または複数分子が含まれる組成物が包含される。

【0165】

10

本発明の再プログラム化因子のスクリーニング方法としては、胚性幹細胞由来の成分を体細胞に接触、注入等の手段により作用させ、本発明の *Stm* 遺伝子-*GFP* マーカー遺伝子の発現、*X* 染色体の活性化等の再プログラム化の指標となる活性を基にその作用を検出し、そして、再プログラム化活性を有していた成分を選択することにより行うことができる。

【0166】

本発明の「胚性幹細胞中に含まれる再プログラム化因子」は、上述のようなスクリーニング方法によりスクリーニングし、取得することができる。再プログラム化因子は、ヒストン *H3-Lys4* のメチル化酵素またはメチル化に関わる因子であり得る。また、このような成分が胚性幹細胞以外（例えば、組織幹細胞）にも含まれる可能性があるが、一度、胚性幹細胞から上述の方法によって、再プログラム化因子が特定されれば、その再プログラム化因子を基に、その他の材料より再プログラム化因子を得ることも、製造することも可能である。例えば、上述の方法により得られた再プログラム化因子が *RNA* であれば、その *RNA* の配列決定を行い、同じ配列の *RNA* を周知の手法により合成することが可能である。また、再プログラム化因子がタンパク質であった場合には、そのタンパク質に対する抗体を作製し、抗体への結合性を利用してその他、そのような因子が含まれ得る材料より再プログラム化因子を取得することができる。また代わりに、このタンパク質の部分アミノ酸配列決定を行い、該アミノ酸をコードする遺伝子とハイブリダイズするようなプローブを作製し、ハイブリダイズ法により該タンパク質をコードする *cDNA* およびゲノム *DNA* を得ることもできる。また、プライマーを作製し、*PCR* 法により、そのような遺伝子を増幅して取得することも考え得る。前述のいずれの方法を含む種々の方法により得られた再プログラム化因子をコードする遺伝子を用いて、周知の遺伝子組換えの手法により目的とする再プログラム化因子を製造することができる。従って、本発明の「胚性幹細胞中に含まれる再プログラム化因子」は、必ずしも胚性幹細胞から得る必要はなく、多能性を有する細胞（たとえば、組織幹細胞）などからも得ることができる。従って、再プログラム化因子には、体細胞を再プログラム化させ得るような全ての因子が包含される。

【0167】

再プログラム化する因子をスクリーニングする方法は、適当な体細胞に対して、胚性幹細胞由来の成分を作用させ、該成分の体細胞を再プログラム化する活性を検出し、そして、再プログラム活性を有する成分を選択することにより達成され得る。本明細書において用いられ得る体細胞としては、リンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞等を例示することができる。特に、これらに限定されるわけではなく、正常な染色体を有した体細胞であり、安定に増殖させることができ、再プログラム化因子の作用により多分化能を有する未分化細胞様に変化することができれば特に限定されない。特に、作用させる胚性幹細胞由来の成分が由来する種由来であることが好ましい（例えば、胚性幹細胞由来の成分がヒト由来である場合、ヒト由来の体細胞）。既に確立されている細胞株を用いることも可能である。

【0168】

本発明の細胞より細胞、組織または臓器を製造する方法において、細胞を分化させる方 50

法は、その細胞の核型が実質的に保持されるような状態で細胞、組織または臓器が分化され得るのであれば特に限定されない。例えば、胚盤胞への導入、マウス等の動物への皮下注射によりテラトーマを形成させること等により細胞、組織、および臓器へと分化させることが可能である。所望の細胞、組織または臓器は、それらの分化された胚盤胞またはテラトーマから単離することができる。インビトロで目的とする種類の細胞を得るために必要とされる細胞増殖因子、成長因子等を添加し、細胞から所望の細胞、組織または臓器を誘導してもよい。現在までに、血管、神経細胞、筋肉細胞、造血細胞、皮膚、骨、肝臓、脾臓等への胚性幹細胞からの誘導が報告されており、本発明の多能性幹細胞からの移植個体に対応する細胞、組織または臓器の製造においても、それらの技術を適用することができる（例えば、Kaufman, D. S., Hanson, E. T., Lewis, R. L., Auerbach, R., and Thomson, J. A. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98, 10716-21; Boheler, K. R., Czyn, J., Tweedie, D., Yang, H. T., Anisimov, S. V., and Wobus, A. M. (2002), Circ Res 91, 189-201)。

【0169】

本発明の細胞からの細胞、組織または臓器の製造方法において幹細胞（たとえば、胚性幹細胞）を使用する場合、適当な個体から幹細胞（たとえば、神経幹細胞、胚性幹細胞）を確立して用いることも可能であるが、既に確立されている、種々の生物由来の幹細胞（たとえば、神経幹細胞、胚性幹細胞）を利用することが好ましい。例えば、マウス、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ミンク、ウサギ、アカゲザルおよびマーモセット等の霊長類、およびヒトの幹細胞（たとえば、胚性幹細胞）を挙げることができる。好ましくは、使用する体細胞と同じ種由来の幹細胞（たとえば、胚性幹細胞）を用いる。

【0170】

（Stm遺伝子の説明）

初期胚由来の胚性幹細胞、胚性幹細胞と始生殖細胞由来の生殖性幹細胞、EG細胞のmRNAを比較し両細胞で高発現する遺伝子を同定した。本新規遺伝子のcDNAの塩基配列を決定した。また、マウスゲノムでの遺伝子の構造を決定した。サザンハイブリダイゼーション解析の結果から、マウスには4個の相同遺伝子があることが推測された。そのうち、cDNAの塩基配列を用いたデータベースの検索から少なくとも1つの相同遺伝子の塩基配列が明らかになっている。また、ヒトデータベース検索の結果から、同様に4個の相同遺伝子の存在が推測された。

【0171】

Stm遺伝子の発現パターンを解析する目的で、初期胚と生殖細胞からtotal RNAを回収し、RT-PCR解析を行った。12、5日齢胚では発現しないが、雌雄生殖巣では発現が認められた。また、未受精卵では発現が検出されなかったが、胚盤胞から7、5日齢胚で発現が検出された。より発生後期の胚では発現が抑制されていた。これらの結果は、本遺伝子が未分化細胞得的に発現することを示している。他の未分化特異的発現遺伝子Oct4との比較により、少なくとも未受精卵での発現パターンが異なる事が示された。胚性幹細胞ではRT-PCRおよびノーザンハイブリダイゼーション法により高発現が認められている。初期胚における本遺伝子の発現部位決定を目的に、現在本遺伝子の制御下にレポーター遺伝子の導入を進めている。

【0172】

Stm遺伝子の医療応用としては以下のようなものが挙げられる。例えば、胚性幹細胞および組織幹細胞などの多分化能性細胞を特異的な組織細胞に分化させ、その細胞移植により機能を肩代わりする再生医療が近未来の治療法として注目されている。胚性幹細胞および他の多能性幹細胞が未分化状態を維持しているかの確認のためには複数のマーカー分子が必要である。本遺伝子は未分化細胞のマーカー遺伝子の一つとして最適である。また、個人の体細胞から再プログラム化という過程を経て再生医療に応用可能な多能性細胞を生み出す機構および因子の解明に世界が注目している。体細胞核の再プログラム化の機構

を知るには複数の未分化特異的マーカーを使い再プログラム化がどの程度進んでいるか知る必要がある。本遺伝子は再プログラム化のマーカーとしても重要な役割を果たす可能性がある。

【0173】

本発明で明らかになったことによれば、Stm遺伝子はOct 3/4と似た遺伝子発現のパターンを示すが、相違点も多々ある。また、ホメオボックスをもち転写因子として働くことが予想される。あるいは、テロメアサイズとの関連、細胞老化マーカーとしてのβガラクトシダーゼ活性との関連も注目される。事実、本発明者らのデータから核への局在が示唆されており未分化性維持に重要な働きを果たすことは確実である。従ってSTMタンパク質は、細胞の若返りをもたらす新薬またはそのスクリーニングのツールとして有用であり得る。 10

【0174】

(好ましい実施形態の説明)

以下に本発明の最良の形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本発明のよりよい理解のために提供されるものであり、本発明の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本発明の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。

【0175】

(Stm遺伝子の核酸形態)

従って、1つの局面において、本発明は、Stm遺伝子に関する。そのようなStm遺伝子は、 20

(a) 配列番号1、3、5または29に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2、4、6または30に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号2、4、6または30に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号1、3、5または29に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体である、ポリヌクレオチド； 30

(e) 配列番号2、4、6または30に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの種相同体をコードする、ポリヌクレオチド；

(f) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(g) (a)～(e)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、 40

を含む、

核酸分子であり得る。

【0176】

1つの好ましい実施形態において、上記(c)における置換、付加および欠失の数は、限定され、例えば、50以下、40以下、30以下、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する(好ましくは、Stm1遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する)限り、多い数であってもよい。

【0177】

別の好ましい実施形態において、上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性として 50

は、例えば、配列番号 2、4、6 または 30 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、未分化性維持などが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、そのような生物学的活性は、未分化性維持を含む。S t m は細胞の未分化性維持に重要な働きをしていると考えられる。具体的にはホメオドメインをもつことから組織細胞に分化を誘導する様な下流遺伝子の発現を抑制していると推測される。この活性を測定するためには、遺伝子欠損実験、RNA i 実験、抗体によるタンパク質機能阻害実験等が考えられる。

【0178】

別の好ましい実施形態において、対立遺伝子変異体は、配列番号 1、3、5 または 29 に示す核酸配列と少なくとも 90% の相同性を有することが好ましい。同一系統内のもの
15
などでは、例えば、そのような対立遺伝子変異体は少なくとも 99% の相同性を有することが好ましい。さらに好ましくは、そのような対立遺伝子変異体は、99.7% 以上の相同性を有することが有利である。特に、そのような対立遺伝子変異体は、S t m 1 遺伝子と S t m 2 遺伝子との間で相違する配列は相違したままであることが好ましい。

【0179】

上記種相同体は、その種の遺伝子配列データベースが存在する場合、そのデータベースに対して、本発明の S t m 遺伝子をクエリ配列として検索することによって同定することができる。あるいは、本発明の S t m 遺伝子の全部または一部をプローブまたはプライマーとして、その種の遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することが
20
できる。そのような同定方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載される文献にも記載されている。種相同体は、例えば、配列番号 1、3、5 または 29 に示す核酸配列と少なくとも約 30% の相同性を有することが好ましい。種相同性は、好ましくは、配列番号 1、3、5 または 29 に示す核酸配列と少なくとも約 50% の相同性を有する。

【0180】

好ましい実施形態において、上記 (a) ~ (e) のいずれか 1 つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約 80% であり得、より好ましくは少なくとも約 90% であり得、さらに好ましくは少なくとも約 98% であり得、もっとも好ましくは少なくとも約 99% であり得る。

【0181】

好ましい実施形態において、本発明の核酸分子は、少なくとも 8 の連続するヌクレオチドであり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも 10 の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも 15 の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも 20 の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16 など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、...、30、など）であってよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、マーカー）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号 1、3、5 または 29
40
に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約 8 のヌクレオチド長であり得、好ましくは約 10 ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約 15 ヌクレオチド長であり得、好ましくは約 17 ヌクレオチド長であり得る。

【0182】

より好ましい実施形態において、本発明は、(a) 配列番号 1、3、5 または 29 に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；または (b) 配列番号 2、4、6 または 30 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドであり得る。

【0183】

ある好ましい実施形態において、本発明の核酸分子は、(a) 配列番号 3 に記載の塩基
50

配列の1037位～1607位もしくは244位～1126位またはそれらに対応する位置の塩基配列、あるいはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) (a) のポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(c) (a) ～ (b) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
を含み得る。ここで、Stmマーカーとして使用することができる配列は、例えば、配列番号3における1037～1056位(F1 primer)と1607～1587位(R1 primer)との間の領域、244～253位(F2 primer)と1126～1107位(R2 primer)との間の領域、ならびにそれらに対応する遺伝子(例えば、配列番号1または5、あるいは配列番号7または9に示される配列によってコードされる遺伝子)の対応する位置のものがそれらに限定されない。

【0184】

ここで、より好ましい実施形態では、上記(a)～(b)のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

【0185】

好ましい実施形態において、本発明のStm遺伝子をコードする核酸分子またはそのフラグメントおよび改変体は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数(例えば、9、11、12、13、14、16など)あるいは、それ以上の数(例えば、21、22、...、30、など)であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途(例えば、アンチセンス、RNAi、マーカー、プライマー、プローブ、所定の因子と相互作用し得ること)として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号1、3、5または29に示す配列の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

【0186】

別の好ましい実施形態において、本発明は核酸分子、配列番号1、3、5または29において、配列番号7もしくは9またはそれらに対応するStm2の核酸配列の対応する配列と相違する配列を少なくとも1つの位置において有する。このような位置は、対象となる少なくとも2つの配列をアラインメントすることによって容易に決定することができる。このような配列は、Stm1遺伝子のみに特異的であり得ることから、Stm1とStm2とを識別することが必要なときに有用である。好ましい実施形態では、この相違する配列を有する部分は、制限酵素で消化され得る。このような制限酵素は、配列が与えられ、当業者は容易に決定することができる。例えば、本発明では、配列番号3と9とを比較する場合、BsaMI(GAATGCを認識する)およびNlaIII(CATGを認識する)の少なくとも2種類の制限酵素を使用することができる。

【0187】

(Stm遺伝子のポリペプチド形態)

別の局面において、本発明は、Stm遺伝子産物(本明細書においてStmポリペプチドともいう)に関する。

【0188】

好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、

(a) 配列番号 2、4、6 または 30 に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 2、4、6 または 30 に記載のアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも 1 つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；

(c) 配列番号 1、3、5 または 29 に記載の塩基配列のスプライス変異体または対立遺伝子変異体によってコードされる、ポリペプチド；

(d) 配列番号 2、4、6 または 30 に記載のアミノ酸配列の種相同体である、ポリペプチド；または

(e) (a) ~ (d) のいずれか 1 つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも 70 % であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドであり得る。

【0189】

1 つの好ましい実施形態において、上記 (b) における置換、付加および欠失の数は限定されていてもよく、例えば、50 以下、40 以下、30 以下、20 以下、15 以下、10 以下、9 以下、8 以下、7 以下、6 以下、5 以下、4 以下、3 以下、2 以下であることが好ましい。より少ない数の置換、付加および欠失が好ましいが、生物学的活性を保持する（好ましくは、Stm1 遺伝子産物と類似するかまたは実質的に同一の活性を有する）限り、多い数であってもよい。

【0190】

別の好ましい実施形態において、上記 (c) における対立遺伝子変異体は、配列番号 2、4、6 または 30 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 90 % の相同性を有することが好ましい。好ましくは (c) における対立遺伝子変異体は、配列番号 2、4、6 または 30 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 99 % の相同性を有する。

【0191】

別の好ましい実施形態において、上記種相同体は、本明細書中上述のように同定することができ、配列番号 2、4、6 または 30 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 30 % の相同性を有することが好ましい。種相同性は、好ましくは、配列番号 1、3、5 または 29 に示す核酸配列と少なくとも約 50 % の相同性を有する。

【0192】

別の好ましい実施形態において、上記 (e) における上記改変体ポリペプチドが有する生物学的活性としては、例えば、配列番号 2、4、6 または 30 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはそのフラグメントに対して特異的な抗体との相互作用、転写制御活性、未分化性維持などが挙げられるがそれらに限定されない好ましくは、そのような生物学的活性は、未分化性維持を含む。Stm は細胞の未分化性維持に重要な働きをしていると考えられる。具体的にはホメオドメインをもつことから組織細胞に分化を誘導する様な下流遺伝子の発現を抑制していると推測される。この活性を測定するためには、遺伝子欠損実験、RNAi 実験、抗体によるタンパク質機能阻害実験等が考えられる。

【0193】

好ましい実施形態において、上記 (a) ~ (d) のいずれか 1 つのポリペプチドに対する同一性は、少なくとも約 80 % であり得、より好ましくは少なくとも約 90 % であり得、さらに好ましくは少なくとも約 98 % であり得、もっとも好ましくは少なくとも約 99 % であり得る。

【0194】

本発明のポリペプチドは、通常、少なくとも 3 の連続するアミノ酸配列を有する。本発明のポリペプチドが有するアミノ酸長は、目的とする用途に適合する限り、どれだけ短くてもよいが、好ましくは、より長い配列が使用され得る。従って、好ましくは、少なくとも 4 アミノ酸長、より好ましくは 5 アミノ酸長、6 アミノ酸長、7 アミノ酸長、8 アミノ酸長、9 アミノ酸長、10 アミノ酸長であってもよい。さらに好ましくは少なくとも 15

アミノ酸長であり得、なお好ましくは少なくとも20アミノ酸長であり得る。これらのアミノ酸長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、...、30、など）であってもよい。本発明のポリペプチドは、目的とする用途（例えば、免疫原、マーカー）として使用することができる限り、その上限の長さは、配列番号2、4、6または30に示す配列の全長と同一であってもよく、それを越える長さであってもよい。

【0195】

好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、

(a) 配列番号4に記載のアミノ酸配列の157位～218位（ホメオドメイン）、261位～301位（Wリッチ領域）もしくは399位～455位（B2反復配列領域）またはそれに対応する位置のアミノ酸配列、またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド；

(b) 配列番号2、4、6または30に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド；または

(c) (a)～(b)のいずれか1つのポリペプチドに対する同一性が少なくとも70%であるアミノ酸配列を有し、かつ、生物学的活性を有する、ポリペプチド、を含む、ポリペプチドであり得る。そのようなStmマーカーとして使用することができるポリペプチドの特徴的ドメインとしては、cDNAの位置（配列番号3）に対応させると、

特徴的ドメイン	cDNAポジション
ホメオドメイン	cDNAポジション； 469bp-654bp
Wリッチ領域	cDNAポジション； 781bp-903bp
B2反復配列領域	cDNAポジション； 1195bp-1365bp
オクタマー結合配列	cDNAポジション； 1789bp-1796bp (AC TAGCAT)

によってコードされる領域ならびにそれらに対応する遺伝子（例えば、配列番号1または5、あるいは配列番号7または9に示される配列によってコードされる遺伝子）の対応する位置のものがそれらに限定されない。上記領域は、ポリペプチド配列では、配列番号4に記載のアミノ酸配列の157位～218位（ホメオドメイン）、261位～301位（Wリッチ領域）もしくは399位～455位（B2反復配列領域）またはそれに対応する位置のアミノ酸配列、またはそのフラグメントからなる、ポリペプチド、あるいはそれらに対応するポリペプチド（例えば、配列番号2または6、あるいは配列番号8または10に示される配列によってコードされる遺伝子）の対応する位置のものがそれらに限定されない。

【0196】

ここで、さらに好ましい実施形態において、上記(a)～(b)のいずれか1つのポリペプチドに対する同一性は、少なくとも約80%であり得、より好ましくは少なくとも約90%であり得、さらに好ましくは少なくとも約98%であり得、もっとも好ましくは少なくとも約99%であり得る。

【0197】

別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号2、4、6または30において、配列番号8もしくは10またはそれに対応するStm2のアミノ酸配列の対応する配列と相違する配列を少なくとも1つの位置において有する。このような位置は、対象となる少なくとも2つの配列をアラインメントすることによって容易に決定することができる。このような配列は、Stm1ポリペプチドのみに特異的であり得ることから、Stm1とStm2とを識別することが必要なときに有用である。好ましい実施形態では、このような相違する配列を有する部分は、ペプチダーゼまたはプロテアーゼで消化され得る。このような酵素は、当業者であれば、配列情報にもとづいて当該分野において周知の方法を用いて決定することができる。

【0198】

(S t m遺伝子の核酸形態に対する因子)

1つの局面において、本発明は、S t m遺伝子をコードする核酸分子に対して特異的に相互作用する因子を含む、組成物を提供する。したがって、本発明は、本明細書に記載される任意のS t m遺伝子をコードする核酸分子またはその改変体もしくはフラグメントに対して特異的な因子を提供する。ここで、診断、予防、処置または予後上有効な量は、当該分野において周知の技法を用いて当業者が種々のパラメータを参酌しながら決定することができ、そのような量を決定するためには、例えば、使用目的、対象疾患（種類、重症度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、細胞の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明では、S t m 1 遺伝子の発現が、未分化状態（特に、多能性、より特定すると全能性）に対応していることが明らかになったことによって、そのような状態、性質を同定するために効率よく使用される。特に、従来のO c t 3 / 4 よりも多能性、全能性に対する親和性が高く、その検出効率は格段に上がるものと考えられる。このような効果は従来知られておらず、したがって、本発明の因子は、従来技術により提供されるものより優れた効果を示す。

【0199】

好ましい実施形態において、本発明の因子は、核酸分子、ポリペプチド、脂質、糖鎖、有機低分子およびそれらの複合分子からなる群より選択される因子であり得る。このような因子は、本発明の核酸分子に特異的に結合するものであれば、どのようなものでもよいことが理解され得る。

【0200】

好ましい実施形態では、本発明の因子は、核酸分子である。本発明の因子が核酸分子である場合、そのような核酸分子は、少なくとも8の連続するヌクレオチド長であり得、好ましくはS t mの核酸配列（例えば、配列番号1、3、5または29）に対して特異的に結合し得る。本発明の核酸分子は、本発明の使用目的によってその適切なヌクレオチド長が変動し得る。より好ましくは、本発明の核酸分子は、少なくとも10の連続するヌクレオチド長であり得、さらに好ましくは少なくとも15の連続するヌクレオチド長であり得、なお好ましくは少なくとも20の連続するヌクレオチド長であり得る。これらのヌクレオチド長の下限は、具体的に挙げた数字のほかに、それらの間の数（例えば、9、11、12、13、14、16など）あるいは、それ以上の数（例えば、21、22、...、30、など）であってもよい。本発明の核酸分子は、目的とする用途（例えば、アンチセンス、RNA i、マーカー、プライマー、プローブ）として使用することができるかまたは所定の因子と相互作用することができる限り、その上限の長さは、配列番号1、3、5または29などに示す配列またはその相補体の全長であってもよく、それを超える長さであってもよい。あるいは、プライマーとして使用する場合は、通常少なくとも約8のヌクレオチド長であり得、好ましくは約10ヌクレオチド長であり得る。プローブとして使用する場合は、通常少なくとも約15ヌクレオチド長であり得、好ましくは約17ヌクレオチド長であり得る。

【0201】

従って、1つの例示的な実施形態において、本発明の因子は、S t m遺伝子をコードするポリヌクレオチドの核酸配列に対して相補的な配列またはそれに対して少なくとも70%の同一性を有する配列を有する核酸分子であり得る。

【0202】

別の例示的な実施形態において、本発明の因子は、(a) 配列番号1、3、5または29に記載の塩基配列もしくはその相補体またはそのフラグメント配列を有する、ポリヌクレオチド；(b) 配列番号2、4、6または30に記載のアミノ酸配列またはそのフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；(c) 配列番号2、4、6または30に記載のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が、置換、付加および欠失からなる群より選択される少なくとも1つの変異を有する改変体ポリペプチドであって、生物学的活性を有する改変体ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；(d) (a) ~ (c) のいずれ

か1つのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または(e) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、のいずれかのStm遺伝子の核酸配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子であり得る。ストリンジェンシーは、高くても、中程度であっても、低くてもよく、程度は、当業者が適宜状況に応じて決定することができる。

【0203】

あるいは、本発明の因子は、配列番号1、3、5または29で示される配列またはその相補体を含む核酸分子に対して特異的な因子であることが好ましい。このような配列は、未分化または多能性を有する（特に、全能性を有する）組織において存在する形態のStm1遺伝子発現を同定することができることから、ある組織または個体の分化の程度を調べるために有用である。

【0204】

(Stm遺伝子のポリペプチド形態に対する因子)

別の局面において、本発明は、本発明のポリペプチドに対して特異的に結合する因子およびそれを含む組成物に関する。そのような因子としては、例えば、ポリペプチド（例えば、抗体、単鎖抗体）、ポリヌクレオチド、糖鎖、脂質、およびそれらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。このような因子は、本発明のポリペプチドに特異的に結合するものであれば、どのようなものでもよいことが理解され得る。より好ましくは、本発明の因子は、抗体またはその誘導体（例えば、単鎖抗体）である。従って、本発明の因子は、プローブおよび/またはインヒビターとして使用することができる。好ましい実施形態において、本発明の因子は、標識されているかまたは標識と結合し得るものであることが有利であり得る。そのように標識がされている場合、本発明の因子によって測定することができる種々の状態を直接および/または容易に測定することができる。そのような標識は、識別可能に標識される限り、どのような標識でもよく、例えば、蛍光、リン光、化学発光、放射能、酵素基質反応および抗原抗体反応などの技法が挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、その因子が抗体などの免疫反応を利用して相互作用する場合、ビオチン-スト렙トアビジンのような免疫反応においてよく利用される系を用いてもよい。

【0205】

好ましい実施形態では、本発明の上記因子は、抗体であり得る。抗体は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体であってもよく、それらの、ヒト化抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ抗体、ならびにそれらの断片、例えばF(ab')₂およびFab断片、ならびにその他の組換えにより生産された結合体などであってもよい。このような抗体は、本発明の遺伝子の発現を判定する道具として用いることができ、従ってスクリーニングに使用することができる。

【0206】

(本発明の核酸分子の遺伝子工学形態)

別の局面において、本発明は、本発明の核酸分子を含む発現カセットおよびベクターに関する。本発明の発現カセットおよびベクターは、好ましくは、本発明の核酸分子に作動可能に連結された制御配列をさらに含む。このように制御配列を含むことによって、本発明の核酸分子の発現の制御が容易になる。そのような制御配列としては、例えば、プロモーター配列、エンハンサー配列、ターミネーター配列、イントロン配列などが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、そのような制御配列は、本発明の核酸分子の発現を誘導することができる。

【0207】

さらに好ましい実施形態において、本発明の発現カセットおよびベクターは、選択マーカーをコードする配列をさらに含む得る。そのような選択マーカーとしては、例えば、外来遺伝子、細胞性遺伝子、および抗生物質耐性遺伝子が挙げられるがそれらに限定されな

い。抗生物質耐性遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などが挙げられるがそれらに限定されない。細胞性遺伝子としては、例えば、増殖因子のようなサイトカインをコードする遺伝子、増殖因子レセプターをコードする遺伝子、シグナル形質導入分子をコードする遺伝子、および転写因子をコードする遺伝子が挙げられるがそれらに限定されない。別の好ましい実施形態では、選択マーカーは、不死化遺伝子（例えば、hcl-2）であり得る。あるいは、選択マーカーは、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPR T）、毒性産物をコードする遺伝子、自殺基質と組合せて条件により活性な毒性遺伝子産物（例えば、ガンシクロビル（ganciclovir）と組合せた単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（HSV-TK））、および単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（HSV-TK）遺伝子であり得る。

【0208】

（細胞形態）

別の局面において、本発明は、Stm遺伝子をコードする核酸配列（例えば、本発明の核酸分子）を含む細胞に関する。本発明の核酸分子を細胞に導入する方法は、当該分野において周知であり、本明細書において上記節において詳述されている。あるいは、そのような細胞は、細胞を含むサンプル中において、その核酸分子を含む細胞をスクリーニングすることによって、同定することができる。本発明の核酸分子を含む細胞は、好ましくは、未分化状態であり得る。本発明の核酸分子が発現している細胞は、通常未分化状態である。したがって、そのような核酸分子が制御可能に発現されるように導入された細胞は、その未分化状態を制御することができる。あるいは、そのような細胞を用いて、本発明の核酸分子を大量に生産することができる。そのような生産方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載された文献に記載されている。

【0209】

（組織形態）

別の局面において、本発明は、Stm遺伝子をコードする核酸配列を含む組織に関する。そのような核酸配列は、制御配列に作動可能に連結されることが好ましい。そのような組織は、動物組織であってもよく、他の生物（例えば、植物）の組織であってもよい。あるいは、そのような組織を用いて、本発明の核酸分子を大量に生産することができる。そのような生産方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載された文献に記載されている。

【0210】

（生物形態）

別の局面において、本発明は、Stm遺伝子をコードする核酸配列を含む生物（例えば、動物）に関する。そのような核酸配列は、制御配列に作動可能に連結されることが好ましい。そのような生物は、動物であってもよく、他の生物（例えば、植物）であってもよい。あるいは、そのような生物を用いて、本発明の核酸分子を大量に生産することができる。そのような生産方法は、当該分野において周知であり、本明細書において記載された文献に記載されている。Stm遺伝子が分化細胞に特異的な遺伝子の発現を抑制するとすれば、ある方向への分化誘導を抑制する可能性がある。つまり、分化の方向を決定づける働きがあり再生医療への応用の可能性が考えられる。

【0211】

（濃縮組成物形態）

別の局面において、本発明は、Stm1遺伝子をコードする核酸分子のような本発明の核酸分子を含む細胞が濃縮された、組成物に関する。このような細胞は、Stm遺伝子が発現される場合、通常、未分化状態を有することから、そのような細胞が濃縮された組成物は、通常より多くの未分化状態の細胞（例えば、多能性幹細胞、胚性幹細胞など）を含むといえる。そのような核酸分子を含む細胞を濃縮する方法は、当該分野において周知であり、例えば、免疫表現型分類を利用する方法（例えば、抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いる磁気分離、パニング、フローサイトメトリーなど）が挙げられるがそれらに限定されない。

【0212】

別の局面において、本発明は、S t m遺伝子のプロモーター部分の配列を含む核酸分子に関する。そのようなプロモーター部分は、配列番号1、3、5または29に示す配列の転写開始点(A T G)から上流1300-1500bpの200bpの間の領域であり得る。この領域には、S p 1およびA P - 2の結合可能配列が存在し、この領域が発現制御に重要な働きをすることが予想されるからである。S t m遺伝子では、S t m 1のゲノム塩基配列で、転写開始点から5プライム上流2.5 kbとp o l y A配列から3プライム下流3.9 kbを含むトランスジーンで発現が見られることから、このことから少なくともこれらの領域に転写を誘導するために必要十分な塩基配列(プロモーター領域)を含むと推測される。正確な位置は、当業者であれば、容易に決定することができ、そのような技術は周知慣用されている。したがって、そのような技術によって同定されたプロモーターの正確な位置もまた本発明の範囲内にある。

【0213】

(プロモーター形態)

1つの局面において、本発明は、S t m 1のプロモーターに関する。このようなプロモーターは、S t m 1の発現特性を担うと考えられることから、未分化状態に特異的な構築物を作製するために利用することができる。

【0214】

従って、1つの局面において、本発明は、S t m 1のプロモーター配列を含む核酸構築物を提供する。このプロモーター配列を含む核酸構築物は、未分化細胞の選択に使用することができる。

【0215】

特定の好ましい実施形態において、本発明のプロモーター配列は、

(a) 配列番号34またはそれに対応する配列(典型的には、転写開始配列の上流2.3 kb)に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号34またはそれに対応する配列(典型的には、転写開始配列の上流2.3 kb)の対立遺伝子変異体またはそのフラグメントである、ポリヌクレオチド；

(c) (a) ~ (b) のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(d) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
の内のプロモーター活性領域を含む。このような活性領域の特定は、当該分野において周知の技法を用いて行うことができる。

【0216】

より好ましくは、本発明のプロモーター配列は、

(a) 配列番号31、32または33に記載の塩基配列またはそのフラグメント配列を有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号31、32または33に記載の塩基配列の対立遺伝子変異体またはそのフラグメントである、ポリヌクレオチド；

(c) (a) ~ (b) のいずれか1つのポリヌクレオチドにストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；または

(d) (a) ~ (c) のいずれか1つのポリヌクレオチドまたはその相補配列に対する同一性が少なくとも70%である塩基配列からなり、かつ、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
を含む、核酸配列である。

【0217】

ここで、本発明のS t m 1のプロモーターは、少なくとも10の連続するヌクレオチド

長を有し、好ましくはこのヌクレオチド長は、少なくとも15の連続するヌクレオチド長、より好ましくは、少なくとも20の連続するヌクレオチド長、より好ましくは、少なくとも25の連続するヌクレオチド長、より好ましくは、少なくとも50の連続するヌクレオチド長であり得る。別の好ましい実施形態では、本発明のS t m 1のプロモーターは、不連続のヌクレオチドが連結された構造をとっていてもよい。プロモーター活性は、連続しない複数の領域が担っていることがあり得るからである。したがって、そのような不連続な構造もまた、本発明の範囲内にあり、そのような不連続構造は、本明細書の開示に基づき当業者が容易に作製することができる。

【0218】

特定の好ましい実施形態において、上記生物学的活性は、プロモーター活性であるがそれ10
に限定されない。プロモーター活性は、当該分野において周知の技法を用いて測定することができ、そのような技法は、本明細書においても記載されており、実施例において例示されている。

【0219】

別の局面において、本発明は、S t m遺伝子プロモーター部分（本明細書においてS t m遺伝子プロモーターともいう）の核酸配列を含むベクターに関する。本発明のベクターにおいて、好ましくは、S t m遺伝子プロモーター部分の核酸配列には、外来遺伝子（例えば、マーカー遺伝子）が作動可能に連結されている。このような構造を含むベクターで細胞を形質転換することによって、その細胞の未分化状態が、上記外来遺伝子の発現20
として観察することができるようになる。したがって、マーカー遺伝子として蛍光物質をコードする遺伝子（例えば、緑色蛍光遺伝子など）を用いることにより、未分化状態の細胞を容易に観察することができるようになる。そのような外来遺伝子は、好ましくは、その細胞にとって無害であることが好ましい。より好ましくは、移植が意図される場合、その移植の宿主にとって無害であることが有利であり得る。

【0220】

1つの好ましい実施形態において、本発明の、S t m遺伝子プロモーターを含むベクターは、選択マーカーをコードする配列をさらに含み得る。このような選択マーカーとしては、例えば、例えば、外来遺伝子、細胞性遺伝子、および抗生物質耐性遺伝子が挙げられるがそれらに限定されない。抗生物質耐性遺伝子としては、例えば、ネオマイシン耐性遺30
伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などが挙げられるがそれらに限定されない。細胞性遺伝子としては、例えば、増殖因子のようなサイトカインをコードする遺伝子、増殖因子レセプターをコードする遺伝子、シグナル形質導入分子をコードする遺伝子、および転写因子をコードする遺伝子が挙げられるがそれらに限定されない。別の好ましい実施形態では、選択マーカーは、不死化遺伝子（例えば、b c l - 2）であり得る。あるいは、選択マーカーは、H P R T、毒性産物をコードする遺伝子、自殺基質と組合せて条件により活性な毒性遺伝子産物、および単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（H S V - T K）遺伝子であり得る。

【0221】

本発明の核酸構築物は、本発明のプロモーターとは異なる由来の外来遺伝子をコードする配列を、本発明のプロモーター配列に対して作動可能に連結されて、含み得る。このよ40
うな核酸構築物は、未分化状態に特異的に外来遺伝子を発現させることができる。ここで、1つの実施形態では、外来遺伝子は、選択マーカーをコードする。

【0222】

1つの実施形態では、選択マーカーとしては、例えば、核酸構築物が導入される宿主の培地での選択を可能にするものが選択される。そのような選択マーカーとしては、例えば、ボキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（h p r t）、チミジンキナーゼ（T K）遺伝子などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0223】

別の実施形態において、本発明の核酸構築物において使用される選択マーカーは、核酸構築物が導入される宿主での視覚での選択を可能にするものであり得る。そのような選択50

マーカーとしては、例えば、緑色蛍光プロテイン（GFP）、青色蛍光プロテイン（CFP）、黄色蛍光プロテイン（YFP）および赤色蛍光プロテイン（dsRed）などの生細胞での観察が可能な蛍光色素マーカーまたは色素マーカー遺伝子が挙げられるがそれらに限定されない。

【0224】

別の実施形態では、上記選択マーカーは、本発明の核酸構築物が導入される宿主に対して実質的に毒性を示さないことが好ましい。

【0225】

（プロモーターを有する細胞）

別の局面において、本発明は、Stm遺伝子プロモーターまたはそのプロモーターを含む核酸構築物を含む細胞に関する。本発明のStm遺伝子プロモーターをコードする核酸配列を細胞に導入する方法は、当該分野において周知であり、本明細書において上記節において詳述されている。あるいは、そのような細胞は、細胞を含むサンプル中において、Stm遺伝子プロモーターを含む細胞をスクリーニングすることによって、同定することができる。外来遺伝子（例えば、マーカー遺伝子）がStm遺伝子のプロモーター部分の核酸配列に作動可能に連結されている場合、そのような外来遺伝子の発現を観察することによって、その細胞の未分化状態を判定することができる。従って、好ましい実施形態では、本発明の細胞は、それ以外の細胞、種に由来する（例えば、異種の）Stm1のプロモーターを有し得る。

【0226】

（プロモーターを有する組織）

別の局面において、本発明は、Stm遺伝子プロモーターをコードする核酸配列またはそのプロモーターを含む核酸構築物を含む組織に関する。そのような核酸分子は、外来遺伝子（例えば、マーカー遺伝子）に作動可能に連結されることが好ましい。そのような組織は、動物組織であってもよく、他の生物（例えば、植物）の組織であってもよい。

【0227】

（プロモーターを有する生物）

別の局面において、本発明は、Stm遺伝子プロモーターをコードする核酸配列またはそのプロモーターを含む核酸構築物を含む生物（例えば、動物）に関する。そのような核酸分子は、制御配列に作動可能に連結されることが好ましい。そのような生物は、動物であってもよく、他の生物（例えば、植物）であってもよい。Stm遺伝子が分化細胞に特異的な遺伝子の発現を抑制するとすれば、ある方向への分化誘導を抑制する可能性がある。つまり、分化の方向を決定づける働きがあり再生医療への応用の可能性が考えられる。

【0228】

（プロモーターを有する細胞濃縮組成物）

別の局面において、本発明は、Stm1遺伝子プロモーターをコードする核酸配列が発現されたを含む細胞が濃縮された、組成物に関する。このような細胞は、Stmプロモーターが発現を誘導する遺伝子が発現される場合、通常、未分化状態を有することから、そのような細胞が濃縮された組成物は、通常より多くの未分化状態の細胞（例えば、多能性幹細胞、胚性幹細胞など）を含むといえる。そのような核酸分子を含む細胞を濃縮する方法は、当該分野において周知であり、例えば、免疫表現型分類を利用する方法（例えば、抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いる磁気分離、パニング、フローサイトメトリーなど）が挙げられるがそれらに限定されない。

【0229】

（判定組成物）

別の局面において、本発明は、細胞の未分化状態を判定するための組成物に関する。この組成物は、Stm遺伝子またはStm遺伝子産物に特異的に反応する因子を含む。このような因子は、Stm遺伝子に特異的に相互作用する因子（例えば、相補配列を有する核酸分子、転写因子のようなポリペプチドなど）、あるいは、Stm遺伝子産物に対する抗体、単鎖抗体などが挙げられるがそれらに限定されない。ここで使用されるStm遺伝子

またはS t m遺伝子産物は、本明細書において上述したような配列を有する核酸分子またはポリペプチドであり得るがそれらに限定されない。当業者は、このような核酸分子およびポリペプチドを、当該分野において周知の技術を用いて改変することができる。そのような改変は、目的とする用途によって当業者が適宜変更することができる。

【0230】

本発明の細胞の未分化状態を判定するための組成物の判定対象は、好ましくは、幹細胞を包含する。本発明において、従来の因子（例えば、O c t 3 / 4 など）よりも普遍的に幹細胞（例えば、神経幹細胞）に発現することが判明した。また、幹細胞でない細胞（未受精卵細胞）には発現しない。このような特徴は、従来のO c t 3 / 4 のような因子ではなかった。したがって、本発明のこのような組成物は、従来の因子を用いた系よりも、より普遍的に幹細胞を含むかどうかを判定することができるという利点を有する。そのような利点は、O c t 3 / 4 などの従来の因子では達成が困難であった格別の効果であるといえる。また、下流遺伝子の発現制御について、O c t 3 / 4 とS t mとの関係について考慮するとより精度の高い判定を行うことができるといえる。

【0231】

ある好ましい実施形態において、幹細胞は、胚性幹細胞、多能性幹細胞、単能性幹細胞、および組織幹細胞からなる群より選択される細胞であり得る。本発明の組成物は、特に、組織幹細胞を含む多能性幹細胞全般の判定に使用することができるという新たな利点を有する。なぜなら、従来のマーカーでは、胚性幹細胞、受精卵細胞のような全能性の幹細胞は判別することができたが、ある程度分化の程度が進んだ組織幹細胞は判定することが困難であったからである。本明細書において意図される幹細胞としては、通常、受精卵細胞、胚性幹細胞のほか、神経幹細胞、網膜幹細胞、毛嚢幹細胞、脾（共通）幹細胞、肝幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、性腺幹細胞、表皮幹細胞、間充組織幹細胞、胚性幹細胞、生殖性幹細胞などが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、そのような幹細胞としては、神経幹細胞、造血幹細胞、表皮幹細胞、間充組織幹細胞などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0232】

本発明の組成物が対象とする細胞は、遺伝子改変されたものであっても、遺伝子改変されていないもの（すなわち、天然に存在する細胞）であってもよい。遺伝子改変の方法は、当該分野において周知であり、そのような方法は、本明細書に記載した文献に詳述されている。当業者は、そのような周知慣用技術を用いて、適宜細胞を遺伝子改変することができる。したがって、そのような細胞は、分化細胞に対して、未分化化（すなわち、多能性付与）するような遺伝子操作がされていてもよい。

【0233】

（未分化判定法）

別の局面において、本発明は、細胞の未分化状態を判定する方法を提供する。この方法は、（I）判定されるべき細胞を提供する工程；（I I）S t m遺伝子またはS t m遺伝子産物に特異的に反応する因子を、該細胞に接触させる工程；および（I I I）該S t m遺伝子が該細胞において発現しているかどうかを確認する工程、を包含する。ここで提供される細胞は、判定が所望される細胞であれば、どのような細胞であってもよい。そのような細胞は、どのような状態でも提供され得るが、好ましくは、アッセイに適切な形態で提供され得る。そのようなアッセイに適切な形態としては、例えば、適切な培地または緩衝液中での提供などが挙げられるがそれらに限定されない。S t m遺伝子またはS t m遺伝子産物に特異的に反応する因子は、S t m遺伝子またはS t m遺伝子産物に反応することができる限り、どのような形態でもよい。そのようなS t m遺伝子またはS t m遺伝子産物は、判定を目的とする細胞の生物種と同一種由来のものであることが好ましい。同一種由来であれば、ほぼ1：1の関係でS t m遺伝子またはS t m遺伝子産物の有無を判定することができるからである。ただし、上記因子に関するS t m遺伝子またはS t m遺伝子産物の由来種は、S t m遺伝子またはS t m遺伝子産物の判定をすることができる限り、判定を目的とするS t m遺伝子またはS t m遺伝子産物の由来種と異なってもよい。

種間で交叉反応することが頻繁に発生するからである。上記 S t m 遺伝子または S t m 遺伝子産物は、本明細書に記載されるような核酸分子またはポリペプチドであってもよいが、それに限定されない。当業者は、このような核酸分子およびポリペプチドを、当該分野において周知の技術を用いて改変することができる。そのような改変は、目的とする用途によって当業者が適宜変更することができる。

【0234】

本発明の細胞の未分化状態を判定する方法は、好ましくは、他の幹細胞マーカーが発現しているかどうかを確認する工程をさらに包含する。他の幹細胞マーカーの発現を判定することによって、より精確度の高い未分化状態の判定が行うことができるからである。そのような他の幹細胞マーカーとしては、例えば、O c t 3 / 4、U T F 1、S o x 1、R e x 1 などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明において用いられる S t m 遺伝子は、S t m 1 遺伝子を含むことが好ましい。S t m 1 は、幹細胞との連動が明確に示されているからである。

【0235】

(未分化細胞調製法)

別の局面において、本発明は、未分化状態の細胞を調製する方法に関する。この調製方法は、(I) 未分化状態の細胞を含むかまたは含むと予測されるサンプルを提供する工程；(II) S t m 遺伝子または S t m 遺伝子産物に特異的に反応する因子を、該サンプルに接触させる工程；(III) 該因子と該 S t m 遺伝子または S t m 遺伝子産物との特異的反応を検出することによって、該 S t m 遺伝子が該サンプル中の細胞において発現しているかどうかを確認する工程；および (IV) 該 S t m 遺伝子が発現している細胞を分離または濃縮する工程、を包含する。上述のサンプルは、未分化状態の細胞を含むかまたは含むと予測されるものであれば、どのようなものでもよい。ここで用いられる細胞はどのような細胞であってもよいが、好ましくは、哺乳動物（例えば、単孔類、有袋類、貧齒類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目）の細胞であり、より好ましくは、ヒトの細胞であり得る。サンプルの調製方法は当該分野において周知の技術を使用することができる。そのような技術は、本明細書において記載された文献にも詳述されており、例えば、細胞を動物から取り出し、その後、適切な培地または緩衝液中に入れることなどが挙げられるがそれらに限定されない。サンプルと、本発明の因子とを接触させる方法は、当該分野において周知の技術を用いることができる。そのような方法としては、例えば、サンプル中に、本発明の因子を含む溶液を加えることなどが挙げられるがそれらに限定されない。本発明の因子と S t m 遺伝子または S t m 遺伝子産物との特異的反応の検出は、当該分野において周知の技術を用いて行うことができる。検出の簡便のため、その因子は標識されていることが好ましい。そのような標識は、どのような標識でもよく、例えば、蛍光標識、化学発光標識、放射能標識などが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、その因子が抗体などの免疫反応を利用して相互作用する場合、ビオチン-ストレプトアビジンのような免疫反応においてよく利用される系を用いてもよい。遺伝子の発現は、そのような特異的反応の有無と相関付けることができる。例えば、発現の程度が既知である細胞の発現レベルと、特異的反応の強度とを相関付けて標準曲線を作成し、このような標準曲線を利用することによって特異的反応から遺伝子発現を定性的または定量的に判定することができる。

【0236】

未分化状態の細胞を調製する方法において用いられる S t m 遺伝子または S t m 遺伝子産物は、本明細書に記載されるような核酸分子またはポリペプチドであってもよいが、それに限定されない。当業者は、このような核酸分子およびポリペプチドを、当該分野において周知の技術を用いて改変することができる。そのような改変は、目的とする用途によって当業者が適宜変更することができる。

【0237】

(未分化細胞調製法)

別の局面において、本発明は、未分化状態の細胞を調製する別の方法を提供する。この方法は、(I)細胞を提供する工程；および(II)該細胞中のStm遺伝子の発現を誘導する工程を包含する。ここで用いられる細胞はどのような細胞であってもよいが、好ましくは、哺乳動物（例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目）の細胞であり、より好ましくは、ヒトの細胞であり得る。細胞中に遺伝子を導入する方法は、当該分野において周知であり、目的の遺伝子（たとえば、Stm遺伝子）を導入することができる技術であればどのような技術を用いてもよい。そのような技術としては、例えば、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など（例えば、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法など）が挙げられるがそれらに限定されない。Stm遺伝子は、好ましくは、ベクターを用いて細胞中に導入される。そのようなベクターは、どのようなものを用いてもよいが、好ましくは、pGEMやpBluescript KS+／などを用いることができる。

【0238】

Stm遺伝子の発現を誘導する工程を特徴とする未分化状態の細胞を調製する方法において用いられるStm遺伝子またはStm遺伝子産物もまた、本明細書に記載されるような核酸分子またはポリペプチドであってもよいが、それに限定されない。当業者は、このような核酸分子およびポリペプチドを、当該分野において周知の技術を用いて改変することができる。そのような改変は、目的とする用途によって当業者が適宜変更することができる。

【0239】

（未分化細胞濃縮法）

別の局面において、本発明は、未分化状態の細胞を分離および／または増殖および／または濃縮する方法を提供する。この方法は、(I)細胞を提供する工程；(II)該細胞にStm遺伝子またはStm遺伝子プロモーターを導入する工程；および(III)該Stm遺伝子またはStm遺伝子プロモーターを発現する細胞を選択する工程を包含する。ここで用いられる細胞はどのような細胞であってもよいが、好ましくは、哺乳動物（例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目）の細胞であり、より好ましくは、ヒトの細胞であり得る。細胞中に遺伝子を導入する方法は、当該分野において周知であり、目的の遺伝子（たとえば、Stm遺伝子）を導入することができる技術であればどのような技術を用いてもよい。そのような技術としては、例えば、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など（例えば、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法など）が挙げられるがそれらに限定されない。Stm遺伝子は、好ましくは、ベクターを用いて細胞中に導入される。そのようなベクターは、どのようなものを用いてもよいが、好ましくは、pGEMやpBluescript KS+／などを用いることができる。

【0240】

本発明の、未分化状態の細胞を分離および／または増殖および／または濃縮する方法において用いられるStm遺伝子またはStm遺伝子産物もまた、本明細書に記載されるような核酸分子またはポリペプチドであってもよいが、それに限定されない。当業者は、このような核酸分子およびポリペプチドを、当該分野において周知の技術を用いて改変することができる。そのような改変は、目的とする用途によって当業者が適宜変更することができる。

【0241】

（未分化判定キット）

別の局面において、本発明は、細胞の分化状態を判定するキットを提供する。このキットは、(a) Stm遺伝子またはStm遺伝子産物に特異的に反応する因子；および(b)

）該 S t m 遺伝子が該細胞において発現しているかどうかを確認するための手段を備える。S t m 遺伝子または S t m 遺伝子産物に特異的に反応する因子としては、本明細書において記載されるような因子であれば、どのようなものでも使用することができ、そのような因子としては、例えば、抗体、核酸分子などが挙げられるがそれらに限定されない。したがって、このような因子は、S t m 遺伝子または S t m 遺伝子産物に特異的に相互作用する因子（例えば、相補配列を有する核酸分子、転写因子のようなポリペプチドなど）、あるいは、S t m 遺伝子産物に対する抗体、単鎖抗体などが挙げられるがそれらに限定されない。遺伝子発現の確認手段は、当該分野において周知の技術を用いて実施することができる。そのような確認手段としては、例えば、ドットプロット分析、ノーザンプロット分析のような遺伝子産物としての m R N A の分析、ウェスタンプロット分析、E L I S A などの遺伝子産物としてのポリペプチドの分析など挙げられるがそれらに限定されない。そのような分析には、例えば、マイクロタイタープレート、マイクロアレイなどを用いることができる。

【0242】

本発明の、細胞の分化状態を判定するキットにおいて用いられる S t m 遺伝子または S t m 遺伝子産物もまた、本明細書に記載されるような核酸分子またはポリペプチドであってもよいが、それに限定されない。当業者は、このような核酸分子およびポリペプチドを、当該分野において周知の技術を用いて改変することができる。そのような改変は、目的とする用途によって当業者が適宜変更することができる。

【0243】

好ましい実施形態において、本発明の細胞の分化状態を判定するキットは、他の幹細胞マーカーが発現しているかどうかを確認する手段をさらに備える。そのような他の幹細胞マーカーの発現を確認する手段は、原理的には、本発明の S t m 遺伝子の発現を確認する手段と同じものを使用してもよく、異なる原理のものを使用してもよい。好ましくは、そのような他の幹細胞マーカーの発現を確認する手段によって提示される結果は、本発明の S t m 遺伝子の発現を確認する手段が提示する結果と混同しないような表示（例えば、異なる色、異なる蛍光など）をすることが好ましい。そのような他の幹細胞マーカーとしては、例えば、O c t 3 / 4、U T F 1、S o x 1、R e x 1 などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0244】

好ましい実施形態において、本発明のキットにおいて使用される S t m 遺伝子は、S t m 1 遺伝子を含む。

【0245】

（未分化細胞調製キット）

別の局面において、本発明は、未分化状態の細胞を調製するためのキットを提供する。このキットは、（I）S t m 遺伝子または S t m 遺伝子産物に特異的に反応する因子；（I I）該 S t m 遺伝子が該サンプル中の細胞において発現しているかどうかを確認する手段；および（I I I）該 S t m 遺伝子が発現している細胞を分離または濃縮する手段、を備える。

【0246】

本発明の未分化状態の細胞を調製するためのキットにおいて使用される S t m 遺伝子または S t m 遺伝子産物に特異的に反応する因子は、原理的には、本発明の細胞の分化状態を判定するキットにおいて使用されるものと同様のものが使用され得る。好ましくは、細胞の分離または濃縮に適切な形態の因子が使用され得る。例えば、抗 S t m 1 抗体を用いた細胞ソーティングキットで、セルソーターをもちたいり、S t m 1 抗体のついたビーズを用いた精製等が考えられる。

【0247】

S t m 遺伝子がサンプル中の細胞において発現しているかどうかを確認する手段もまた、原理的には、本発明の細胞の分化状態を判定するキットにおいて使用されるものと同様のものが使用され得る。好ましくは、未分化状態の細胞を調製するためのキットにおいて

も、他の幹細胞マーカーが発現しているかどうかを確認する手段をさらに備え得る。そのような他の幹細胞マーカーが発現しているかどうかを確認する手段は、原理的には本発明の細胞の分化状態を判定するキットにおいて使用されるものと同様のものが使用され得る。

【0248】

本発明の未分化状態の細胞を調製するためのキットにおいて使用される *Stm* 遺伝子が発現している細胞を分離または濃縮する手段は、当該分野において使用される細胞分離または濃縮手段であれば、どのようなものでも使用することができる。そのような細胞分離または濃縮手段としては、例えば、磁気分離、パニング、フローサイトメトリー、FACS、アフィニティークロマトグラフィーなどを使用することができる。

10

【0249】

(未分化細胞調製キット)

別の局面において、本発明は、未分化状態の細胞を調製するキットを提供する。このキットは、(I) 細胞中の *Stm* 遺伝子の発現を誘導する手段、を備える。このような *Stm* 遺伝子の発現誘導手段は、当該分野において周知の技術を用いることができる。本明細書において記載されるように、本発明のポリペプチドを利用した抗体およびセルソーティングは本明細書の記載に基づいて実施することができる。したがって、この場合は、キットという形態で実施されてもよいが、抗体の販売もしくは抗体と至適バッファーキットという形態で実施することもできる。表面抗原であればビーズに抗体をつけて精製することが可能であるが、*Stm1* は核局在であるので、その点に留意すれば実施することは容易である。ここで使用される、*Stm* 遺伝子もまた、本明細書に記載されるような核酸分子またはポリペプチドであってもよいが、それに限定されない。当業者は、このような核酸分子およびポリペプチドを、当該分野において周知の技術を用いて改変することができる。そのような改変は、目的とする用途によって当業者が適宜変更することができる。

20

【0250】

別の局面において、本発明の未分化状態の細胞を調製するキットは、(I) 制御配列に作動可能に連結された *Stm* 遺伝子を含むベクターを備える。制御配列としては、当該分野において周知のプロモーター、エンハンサー、ターミネーターなどを使用することができる。ベクター中に含まれる *Stm* 遺伝子もまた、本明細書に記載されるような核酸分子またはポリペプチドであってもよいが、それに限定されない。当業者は、このような核酸分子およびポリペプチドを、当該分野において周知の技術を用いて改変することができる。そのような改変は、目的とする用途によって当業者が適宜変更することができる。

30

【0251】

(プロモーターの利用)

別の局面において、本発明は、未分化細胞から未分化細胞を実質的に含まない分化細胞の集団を生産する方法を提供する。この方法は、a) 選択マーカーを含まない未分化細胞を提供する工程；b) 未分化状態に特異的なプロモーター（例えば、本発明の *Stm1* プロモーター、Oct3/4 プロモーターなど）をコードする配列と該選択マーカー遺伝子とコードする配列とが作動可能に連結された配列を有する核酸構築物を、該未分化細胞に導入する工程；c) 該選択マーカーを含む細胞を選択的に増殖させる培地に該未分化細胞を配置する工程；d) 該未分化細胞を分化誘導する工程；およびe) 該選択マーカーの発現の有無を選択し得る培地に分化された該未分化細胞を配置し、培養する工程、を包含する。

40

【0252】

ここで、未分化細胞としては、例えば、幹細胞（胚性幹細胞、組織幹細胞）が挙げられるがそれらに限定されない。従って、分化細胞を再プログラム化した細胞もまた本発明の対象の範囲内にある。

【0253】

ここで、未分化状態に特異的なプロモーターとしては、例えば、*Stm1* プロモーター配列、Oct3/4 プロモーター配列などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明

50

の開示までは、未分化状態に特異的な遺伝子のプロモーター領域が特定されたという報告はなく、本発明によって初めて達成された発明である。また、組織特異的なエンハンサーの存在が知られている場合（例えば、Oct 3/4）などは、発現パターンの再現には、大きな領域が必要である可能性がある。

【0254】

特定の実施形態において、本発明において利用されるStm1プロモーター配列は、配列番号34またはそれに対応する配列（典型的には、転写開始配列の上流2.3kb）またはその改変体が挙げられ、より好ましくは配列番号31、32または33に示す配列またはその改変体を含む。あるいは、そのようなプロモーター配列は、本明細書において別の場所において記載されるような特定の任意の形態をとり得る。別の好ましい実施形態では、本発明において利用されるStm1プロモーターは、配列番号31、32または33に示す配列またはその改変体を含み、かつ、転写開始配列の上流約2.3kbの全部あるいは一部を含む配列またはその改変体を含む。

【0255】

本発明において使用される選択マーカーとしては、例えば、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（hprt）、または緑色蛍光プロテイン（GFP）、青色蛍光プロテイン（CFP）、黄色蛍光プロテイン（YFP）および赤色蛍光プロテイン（dsRed）からなる群より選択される蛍光マーカーが挙げられるがそれらに限定されない。好ましい実施形態では、本発明において使用される選択マーカーは、hprtを含む。hprtは、グアニンの代謝阻害物質である8-アザグアニンによって選択可能となる。8-アザグアニンは、細胞の発育阻害作用を示し、腫瘍抑制効果がある。6-チオグアニン（6-thioguanine）も同様の作用をもつ。このような阻害作用は、グアニンあるいはグアノシンの投与で解除される。いったん核酸中にとりいれられて阻害作用を示すものと考えられており、プリンヌクレオチド生合成のレベルでも阻害していると考えられる。生体内ではグアニンデアミナーゼ（guanine deaminase）により8-アザキサンチンに分解される。従って、hprt欠損細胞（hprt⁻）は、8-アザグアニンに耐性を示す。このようにして選択を行うことができる。

【0256】

本発明の特定の実施形態において、分化誘導は、任意の分化が企図されるが、例示すると、例えば、神経細胞、筋肉細胞、脂肪細胞、色素細胞、幹細胞、血球系細胞、肝細胞、血管内皮細胞、粘膜上皮細胞および皮膚細胞からなる群より選択される細胞への分化を含む。

【0257】

本発明の方法では、好ましくは、培養後、Stm抗体またはOct 3/4抗体によって、未分化細胞の混入率を確認する工程をさらに包含して未分化細胞がないことを確認することができる。

【0258】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、選択マーカーを含まない未分化細胞を樹立する工程をさらに包含する。選択マーカーを含まない未分化細胞の樹立は、当該分野において周知の技法を応用して行うことが可能である。そのような技法としては、例えば、受精後3.5日齢のマウスから回収した胚盤胞を白血病阻害因子（LIF）を含む任意のES細胞培地で培養する。このとき、不活性化したマウスフィーダー細胞をフィーダー細胞として用いる。増殖してきた内部細胞塊由来の細胞をトリプシン溶液で解離し、再びフィーダー細胞上で培養し、胚性幹細胞を得る。より詳細な条件決定については、Manipulating the Mouse Embryo, 3rd ed. Cold Spring Harbor, USAを参照）。組織幹細胞では、幹細胞が存在すると思われる組織を解離し、または解離後にセルソーターなどを用いて特定の性質を有する細胞を分取した後、特定の細胞増殖因子（例えば、FGF）等を含む培地で培養し、自己増殖能および分化能を有する細胞を得る（神経幹細胞、血球幹細胞などがよい例）。

【0259】

別の好ましい実施形態では、本発明は、上記のような選択マーカーを欠損させた未分化細胞を提供する。このような細胞は、未分化細胞を選択除去することが容易であり、従って、顕著な効果を奏する。

【0260】

別の実施形態において、本発明が対象とする細胞は、マウス、サルおよびヒトからなる群より選択される細胞を含む。ここで細胞に遺伝子を導入する方法は、当該分野において周知の任意の方法を利用することができるが、遺伝子の導入技術としては、トランスフェクション、形質転換および形質導入などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0261】

別の実施形態において、本発明の方法は、培養後、分化細胞のみを選択する工程をさらに包含することが好ましい。分化細胞のみを選択する技法は当該分野において公知の方法を利用して行なう。

【0262】

別の局面において、本発明は、このような未分化細胞を実質的に除去した分化細胞の集団を提供する。別の実施形態では、本発明は、そのような細胞集団から誘導される組織、臓器、生物などを提供する。

【0263】

別の局面では、本発明は、未分化細胞から未分化細胞を実質的に含まない分化細胞の集団を生産する別の方法を提供する。この別の方法は、a) S t m 1のプロモーター配列と該選択マーカー遺伝子とコードする配列とが作動可能に連結された配列を有する核酸構築物を、未分化細胞に導入する工程；b) 該未分化細胞を培養し分化誘導する工程；およびc) 該選択マーカーの発現の有無に基づいて未分化細胞を除去する工程、を包含する、方法。

【0264】

ここで、本発明において使用される選択マーカー、視覚による識別を可能にする。このような選択マーカーとしては、例えば、G F P、C F P、Y F Pおよびd s R e dなどの蛍光マーカーなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0265】

この場合、本発明の方法における未分化細胞の除去は、セルソーターを用いて行なうことができる。このようなセルソーターは、当該分野において周知の物を利用することができるが、例えば、ベクトンディッキンソン(B D)などから市販されているセルソーターを用いることができるがそれらに限定されない。本来未分化細胞で発現が認められないまたは亜種もしくは異種に由来するものであり抗体により区別可能なすべての細胞表面マーカー遺伝子に加え、本明細書において列挙される色素蛍光タンパク質もまた用いることができる。

【0266】

別の局面において、本発明は、このような未分化細胞を実質的に除去した分化細胞の集団を提供する。別の実施形態では、本発明は、そのような細胞集団から誘導される組織、臓器、生物などを提供する。

【0267】

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

【0268】

以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。従って、本発明の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

【実施例】

【0269】

10

20

30

40

50

以下の実施例で用いた動物の取り扱いは、京都大学において規定される基準を遵守した。

。

【0270】

(実施例1: RNAの回収)

本実施例では、Stm遺伝子の同定を行った。

【0271】

各組織からのtotal RNAをTrizol reagent (GIBCO-BRL)を用い、添付のプロトコルに従って回収した。組織は、8週齢の成体マウスの脳、胸腺、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、筋肉、およびE6.5、E7.5、E8.5、E9.5、E12.5、E18.5日齢のマウス胎児を用いた。さらに、E12.5日齢雄および雌マウス胎児の生殖隆起、未受精卵、桑実胚、胚盤胞、胚性幹細胞およびEG細胞からもRNAを回収し実験に用いた。

【0272】

(実施例2: ノーザンブロットハイブリダイゼーション解析)

汎用プロトコル (Alwine et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci., 74: 5350.) をもとにノーザンブロットハイブリダイゼーション解析を行った。胚性幹細胞、EG細胞およびE12.5日齢のマウス胎児から抽出したtotal RNA 10 µgを水に溶かして1%ホルムアルデヒド変性ゲルで電気泳動を行った後Hybond-N+ membrane (Amersham Biosciences) に一晩ブロットした。ブロットしたメンブレンは42℃でプレハイブリダイゼーションを2時間、特異的なプローブでのハイブリダイゼーションを一晩行った後、65℃2×SSC/0.1% SDSで2回、0.1×SSC/0.1% SDSで1回洗った。プローブは、Stm1 cDNAの全長に対してMegaprimer DNA labeling system (Amersham Biosciences)を用いて[α-32P] dCTP (Amersham Biosciences) RI標識した。

【0273】

(実施例3: RT-PCRによる遺伝子発現解析)

RT-PCRによるStm1、Oct4、G3pdh遺伝子の発現解析を目的に、Oligo-dT primerを使用しcDNA合成を行った。DNase I でRNAサンプルを処理した後、RT反応はSuperscript II RT (GIBCO-BRL)を用いて製品のプロトコルに従って行った。PCR増幅はtotal RNA 1 µgを用いて行った。用いたプライマーセットを以下に記載する。

【0274】

F1: 5'-GCGCATTTTAGCACCCACACA-3' (配列番号11) および

R1: 5'-GTTCTAAGTCCTAGGTTTGC-3' (配列番号12);

F2: 5'-GAATTCTGGGAACGCCCTCAT-3' (配列番号13) および

R2: 5'-CCAGATGTTGCGTAAGTCTC-3' (配列番号14);

Oct4 RT/1: 5'-GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC-3' (配列番号15) および

Oct-4 RT/2: 5'-CTCGAACCACATCCTTCTCT-3' (配列番号16);

G3PDH-5: 5'-TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTGTGC-3' (配列番号17) および

G3PDH-3: 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3' (配列番号18)。

【0275】

PCR反応は94℃で5分インキュベーションした後、94℃30秒、60℃30秒、

72℃1分のサイクルを30サイクル行い、最後に72℃で5分インキュベーションする条件で行った。

【0276】

(実施例4: Stm1遺伝子の細胞内発現)

Stm1遺伝子の細胞内発現を見る目的で、Stm1遺伝子にmycタグをつけたmyc-Stm1コンストラクトを作製した。Stm1のcDNAは以下のプライマーセットを用いて得られた産物をpGEM-T Easy vector system (Promega)でTAクローニングしたものを用いた。

【0277】

Stm-f: 5'-CGGGATCCATGAGTGTGGGTCTTCCTG G 10
-3' (配列番号19) および

Stm-r: 5'-TCCCCCGGGTCATATTTTCACCTGGTGGAG
-3' (配列番号20)

このプラスミドを制限酵素BamHIおよびSmaIで切断し、平滑末端処理したcDNAフラグメントをpCMV-myc (CLONTECH) のSalIサイトの平滑末端処理した部分にクローニングすることでpCMV-myc-Stm1プラスミドを作製した。1x10⁵の胚性幹細胞にpCMV-myc-Stm1 1μgをLipofectamine 2000 Reagent (GIBCO-BRL)を使用して遺伝子導入した。

【0278】

20

(実施例5: 細胞免疫染色)

pCMV-myc-Stm1を遺伝子導入した胚性幹細胞を、4% PFAで固定し標準的な培養細胞の免疫染色法 (Willingham, M. C. et. al., 1985. An Atlas of Immunofluorescence in Cultured Cell, Academic Press, Orlando, FL, pp. 1-13.) に従い免疫染色を行った。ブロッキングは0.1% Triton X/PBS/2% skim milkを用い室温で一時間、洗いは0.1% Triton X/PBSを用い室温で5分を4回行った。一次抗体はc-myc モノクローナル抗体 200 μg/ml (CLONTECH)を1/100希釈したものを、二次抗体はFITC標識goat anti-mouse IgG (H+L) (ZYMED L ABORATORIES, INC)を1/200希釈したものを使用した。二次抗体の反応後はrhodamine phalloidin (Molecular Probe), DAPI (SIGMA)の順に染色を行いシグナルを検出した。

【0279】

(Stm遺伝子の発現パターン) (図1, 2)

Stm遺伝子はES (Embryonic Stem) 細胞およびEG (Embryonic Germ) 細胞のmRNAのサブトラクションにより胚性幹細胞およびEG細胞に発現するが12.5日齢胚に発現が見られない遺伝子として本発明者らによって同定された(図1B)。Stmは約2.1 kbの遺伝子でホメオドメイン、B2リピート配列、Wリッチ領域により特徴づけられる(図1A)。成体各組織から回収したtotal RNAを用いたRT-PCR解析の結果、どの組織からも発現が検出されず、その発現は未分化細胞(ES細胞およびEG細胞)に対して非常に高い特性をもっていた(図1C)。Stmにmycタグをつけたコンストラクトを胚性幹細胞に強制発現させ、その局在を抗myc抗体により検出してみると、核への局在が明らかであった(図1D)。この事実はStmがホメオボックスをもつ転写因子として機能する可能性を示唆している。より詳細な発現パターンを未分化細胞が存在する初期胚および生殖巣でRT-PCR法により解析した(図2)。発現はホメオドメインを挟むプライマー、F2-R2により検出した

(図2A)。E6.5-E18.5の着床直後から誕生直前までの胚において解析した結果、未分化細胞が存在するE7.5日齢胚まで発現が見られたが、その後急激に消失した(図2A)。これは、E7.5以降急速に全能性が失われることと関係しているようであ

50

る。発生が進んだE 8. 5日齢以降の胚でもわずかながら発現が見られたがこれはわずかに含まれる生殖細胞での発現を反映したものであることが以降の実験から示された。S t mの発現パターンはO c t 3 / 4の発現パターンとは異なるようであることがわかった。特に未受精卵ではS t mは発現しないことから、より密接に多能性、全能性に本発明のS t m 1遺伝子の発現が相関していることが明らかになった。着床前胚では、双実胚および胚盤胞でS t mおよびO c t 3 / 4共に発現が見られたが、未受精卵ではO c t 3 / 4のみが検出されS t mは見られなかった(図2 B)。このことは、S t mの発現が受精後の核の活性化によるz y g o t i cな発現に起因することを示している。次に、生殖細胞での発現を見るためにE 1 2. 5日齢胚の雌雄生殖巣を解析した。その結果、S t mもO c t 3 / 4も同様に発現していた。この発現が生殖細胞からのものであることを示すために、生殖巣から始原生殖細胞を精製した。生殖細胞の精製度は生殖細胞に特異的な表面抗原への抗体S S E A - 1を用いて行った。3 0 0個以上の細胞を解析した結果9 5 %以上の細胞がS S E A - 1陽性であった(図2 C; 赤く発色)。これらの始原生殖細胞でのS t m発現をみると、O c t 3 / 4同様に陽性であった(図2 C右: D A P Iによる発色)。

【0280】

同様の傾向がS t m 2にもあるかどうかを、特異的制限酵素を用いて調べた。その結果を図2 Dに示す。この図からも明らかなように、S t m 1の発現は、顕著であったが、S t m 2の発現は調べたどの段階(E S細胞、E 7. 5、E 1 2. 5、胚盤胞)でも明らかなではなかった。

【0281】

したがって、S t m遺伝子はO c t 3 / 4遺伝子と似た未分化細胞に特異的な発現パターンを示すが、全く同じではなく機能的な違いがあることが判明した。

【0282】

(抗体作製)

次に、S t m 1の全長アミノ酸配列を用いてウサギポリクローナル抗S t m 1遺伝子産物の抗体を作製した。この抗体量を用いることによって、R N A量に対応した細胞内のS t m 1タンパク質を検出することができた(図2 E)。

【0283】

次に、これらの抗体をもちいて、未分化細胞での局在を調べたところ、S t m 1タンパク質は、未分化細胞の核内に局在していることが明らかになった(図2 F)。

【0284】

マウスS t m抗体がO c t 3 / 4に類似する染色像を示し、共培養しているフィーダー細胞には染色されていないことから、マウス同様に、ヒト、サル、ラットのE S細胞でもS t mが発現していることが明らかになった(図2 G上欄)。

【0285】

次に、マウスE S細胞とリンパ球とが混在するサンプルをS t m抗体染色すると、マウスE S細胞のみが染色される(図2 G中欄)。

次に、S t mタンパク質は、未分化細胞の核内に局在することが示された(図2 G下欄)。

【0286】

次に、S t m抗体を用いて、マウス初期胚発生でのS t m 1タンパク質の局在性を詳細に解析した。これによると、桑実胚まででは発現がないこと、およびE 6. 5日およびE 7. 5日では、胚体外胚葉部(エピブラスト)でのみ発現していることが明らかになった。E 8. 5日では、その発現は、かなり消失していた。さらに、E 6. 5日では、胚体管組織との境界近傍およびE 7. 5日では尾部原条近傍が強く染色されていることがわかった(図2 H)。

【0287】

これらを総合すると、本発明の遺伝子は、未分化な胚性幹細胞で発現しているとして知られるO c t 3 / 4よりも未分化で多能性を示す領域に特異的であることが示されている。

ことになる。したがって、本発明の遺伝子は、未分化性または多能性（好ましくは、全能性）の特定を、従来では達成できなかった効率で達成するという効果を提供する。。

【0288】

（実施例6：ゲノムDNAの回収）

汎用プロトコール（Sambrook and Russell, 1989. Molecular cloning: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA）に従いゲノムDNAの抽出を行った。抽出bufferで細胞を懸濁した後、RNase Aで37℃一時間処理、Proteinase Kで37℃一晩処理を行った。その後フェノール抽出を2回かけてエタノール沈澱によりDNAを回収した。 10

【0289】

（実施例7：サザンブロットハイブリダイゼーション解析）

汎用プロトコール（Southern et. al., J. Mol. Biol., 98: 503-517）に従いサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。まず胚性幹細胞から抽出したゲノム20 μgを水に溶かして1% アガロースゲルで電気泳動を行った後、Hybond-N+ membraneに一晩ブロットした。ブロットしたメンブレンは42℃でプレハイブリダイゼーションを2時間、ハイブリダイゼーションを一晩行った。メンブレンは65℃の2xSSC/0.1% SDSで2回、0.1xSSC/0.1% SDSで1回洗った。プローブは、

exon 2F: 5'-CCTCTCCTCGCCCTTCCT-3'（配列番号21 20）
）および

exon 2R: 5'-CTGCTTATAGCTCAGGTTCAAG-3'（配列番号22）

プライマーセットによりゲノムDNAのPCR増幅によりえられたフラグメントを用いた。Megaprimer DNA labeling system（Amersham Biosciences）を用い[α-32P] dCTP（Amersham Biosciences）によりRI標識されたDNAをプローブとして用いた。

【0290】

（Stm遺伝子の同定）

Stmのホメオボックス領域をプローブとしてマウスゲノムに対するサザンブロットハイブリダイゼーション解析を行うと4つのエクソンからなるStm1遺伝子とイントロンのStm2遺伝子が同定された（図3A, B）。Stm1遺伝子はマウス第6番染色体上に、Stm2遺伝子は7番染色体上に位置しそれぞれ異なる遺伝子座にマップされた。Stm2遺伝子は、正確には7E3にマッピングされた（図3E）。Stm1およびStm2の存在は、Ex 3F-R2およびInt 3F-R2プライマーを用いたゲノムPCR解析によっても再確認された（図3C）。データベースのコンピューター解析により第12番染色体およびX染色体上にホメオドメインへの部分的相同領域を認めた。Stm1およびStm2からの遺伝子発現を区別する目的で、Stm1およびStm2のゲノム上のcDNA領域の配列を比較した。その結果、95%以上の塩基配列が一致していたが、異なる部分を認識する制限酵素でStmのRT-PCR産物を消化することでその由来を決定した。F4-R4のプライマーセットで転写産物の5プライム側を増幅した。BsaMI酵素で消化するとStm1の産物は消化され183および414 bpになるのに対してStm2の産物は消化されない。実際、RT-PCR産物の全てが消化されており、Stm1の産物のみが発現していることが示された（図3D）。同様に、F3-R3のプライマーセットにより増幅された3プライム側の転写産物をNlaIII酵素で消化すると、検出されるDNAフラグメントはStm1のみに由来するものであった（図3D）。第12番染色体の産物も同様に解析を試みたが、発現は認められなかった。これらの結果から、Stm1およびStm2は酷似する配列のRNAをコードするが、実際に転写されるのはStm1からのみであり、Stm2はStm1の擬遺伝子であると結論づけられた。図1および2で検出された転写産物を同様の制限酵素で解析した結果、転写は全てStm 50

1由来であることを確認している。

【0291】

(実施例8：ゲノムの多型解析)

亜種関係にある *Mus musculus domesticus* (汎用実験マウス) および *M. m. molossinus* (実験動物化野性マウス) 由来の胚性幹細胞からゲノムDNAを抽出し、前出のF1およびR1プライマーでPCR増幅を行った。産物をpGEM-T Easy vector systemでTAクローニングし、M13 forwardおよびM13 reverseプライマーを用いたシーケンス反応により両方向からのDNA塩基配列を決定した。シーケンスはキャピラリーシーケンサーCEQ 2000XL DNA Analysis System (BECKMAN COULTER) を用いて行った。塩基配列データを亜種間で比較し、由来を区別できる塩基配列を決定した。また、F1およびR1プライマーを用いてえられたRT-PCR産物を制限酵素SnaBIで切断し、SnaBI認識部位の塩基配列の違いによる感受性の違いから産物の由来を決定した。

【0292】

(実施例9：Stm1およびStm2の発現解析)

Stm1の類似遺伝子Stm2がゲノム上に存在することを、ゲノムDNAを鋳型に

Ex3F: 5'-GTGGTTGAAGACTAGCAATGG-3' (配列番号23)、

Int3F: 5'-CTATGGCTGTTGGGTATGGA-3' (配列番号24) およびR2

の3種類のプライマーを組み合わせてPCRを行い確認した。PCRは、94℃で5分インキュベーションした後、94℃30秒、60℃30秒、72℃1分のサイクルを30サイクル繰り返し、最後に72℃で5分インキュベーションの条件で行った。Ex3F-R2のプライマーの組み合わせではStm1およびStm2の産物のサイズが異なり、Int3F-R2のプライマーの組み合わせではStm1のみが検出された。両遺伝子のゲノム上での存在が示された。

【0293】

Stm1およびStm2の発現を区別する目的で、*M. m. domesticus*の胚性幹細胞から抽出したゲノムDNAを鋳型に、

F3: 5'-CTTTGAAGCTAGCTCTGCAGGA-3' (配列番号25) および

R3: 5'-TGAACTTATTGCATATCTGAG-3' (配列番号26) :

F4: 5'-CAGGGCTATCTGGTGAACG-3' (配列番号27) および

R4: 5'-GAGCACCCGACTGCTCTTC-3' (配列番号28) :

のプライマーセットを用いてPCR増幅した。F3-R3およびF4-R4産物をクローニング、シーケンスし塩基配列を決定および比較した。Stm1およびStm2産物の塩基配列の違いからその由来を決定できた。次に、胚性幹細胞のtotal RNAを鋳型とし、F3-R3およびF4-R4のRT-PCR産物をクローニング、シーケンスした。その結果、得られた転写産物はStm1遺伝子の発現によることが明らかになった。このことは、F3-R3およびF4-R4のRT-PCR産物を制限酵素NlaIIIおよびBsaMIでそれぞれ切断することによりStm1型の転写産物であることから確認された。

【0294】

(実施例10：再プログラム化マーカー遺伝子としてのStm1)

体細胞核が再プログラム化され未分化細胞と同様に振る舞うことが可能であることが、体細胞および胚性幹細胞の細胞融合および体細胞核の除核未受精卵への核移植実験により明らかになっている。前者はクローン細胞を、後者はクローン個体を作製するために有効

な方法であることが経験的に明らかになっているが、再プログラム化の機構は全くわかっていない。未分化細胞に特異的な *Stm1* 遺伝子は、少なくとも以下の2つの応用が考えられる。1) 体細胞核の未分化細胞核への再プログラム化マーカー、2) *Oct 3/4* 遺伝子との比較による再プログラム化機構の解明。1) に迫る目的で細胞融合および核移植の実験を行った。

【0295】

(細胞融合および核移植)

細胞融合実験において、体細胞核からおよび胚性幹細胞核からの *Stm1* 転写産物を区別する目的で、胚性幹細胞または体細胞を *Mus musculus molossinus* 由来のものを用いた。*Molossinus* 由来の胚性幹細胞は当研究室で新たに樹立した。*Molossinus* ゲノムは汎用されるマウス系統 *M. m. domesticus* に対して塩基配列の多型に富むため、*molossinus* および *domesticus* の融合細胞を用いることで転写産物の由来を決定できる。融合細胞作製の方法を図4Aに示した。*Molossinus* 由来の胚性幹細胞を用いた融合細胞が *MxR*、*molossinus* 由来の体細胞を用いた融合細胞が *HxJ* である。*Stm1* は体細胞である胸腺細胞での発現が認められない、一方胚性幹細胞では発現している。*MxR* および *HxJ* の融合細胞クローン全てにおいて *Stm1* が発現していることがわかる (図4B)。*Stm1* 遺伝子が胚性幹細胞核および再プログラム化体細胞核両者から発現していることを確認する目的で、F1-R1プライマーセットを用いたRT-PCR産物を *SnaBI* 制限酵素で消化した。*Molossinus* 由来の転写産物は *SnaBI* 消化に感受性があり、570 bp のバンドが230および340 bp の2本のバンドになる。これに対して、*domesticus* 転写産物は *SnaBI* によって消化されず570 bp のバンドとして残る。*MxR* 及び *HxJ* 融合細胞では *SnaBI* によって消化されたバンドおよび消化されないバンドの両方が検出された。このことから胚性幹細胞核および再プログラム化体細胞核の両方から *Stm1* が転写されていることが示された (図4C)。*Stm1* 遺伝子は体細胞核の再プログラム化マーカー遺伝子として応用可能である。

【0296】

(未分化マーカー)

Stm1 が体細胞核移植での再プログラム化マーカー遺伝子として応用可能か否かを確かめる目的で、(B6xCBA) F1マウス (*domesticus*) の未受精卵から核を除き、JF1マウス (*molossinus*) 卵丘細胞 (体細胞) 核を移植した (図4D)。得られたクローン胚盤胞での *Stm1* の発現を観察した。卵丘細胞では発現していなかった *Stm1* がクローン胚盤胞では発現していた (図4E)。また、核移植胚盤胞で体細胞由来の *Stm1* が発現していることも示された。*Stm1* 転写産物の由来は、*SnaBI* 消化に対する感受性の違いから確認した。クローン胚盤胞では *molossinus* 由来の *Stm1* が発現していた。体細胞および胚性幹細胞の細胞融合および体細胞核移植の実験から *Stm1* が再プログラム化マーカー遺伝子として有用であることが示された。

【0297】

次いで、体細胞核移植クローン胚盤胞における *Stm1* 遺伝子の発現を調べた。(mol x dom) F1クローン胚盤胞由来のmRNAから合成したcDNAをF1-R1プライマー (図1A参照) を用いてPCR増幅した。陽性コントロールとして *Oct 3/4* 遺伝子を用いた。得られた *Stm1* 産物を制限酵素 *SnaBI* で消化した。mol由来の産物は *SnaBI* 消化感受性であるのに対し、dom由来の産物は *SnaBI* 消化耐性である。F1クローン胚盤胞ではdomのみならずmol由来の産物も検出され、核移植により体細胞核由来の *Stm1* が再活性化することが示された。

【0298】

(実施例11：組織幹細胞マーカー遺伝子としての *Stm1*)

胚性幹細胞と並んで組織幹細胞が再生医療への応用から注目を集めている。組織幹細胞は組織の新陳代謝に伴う新たな細胞を供給するための源となる細胞であり、各組織に存在

すると考えられているがその樹立方法および精製のための方法は確立されていない。組織幹細胞の精製における壁の一つが特異的マーカーである。Oct 3/4を発現する組織幹細胞として報告されているのは、骨髄の間質組織幹細胞、MAPCのみである。多能性をもつ幹細胞としてMAPCに加えて脳性幹細胞(NS; Neurosphere)がある。しかし、NSでのOct 3/4の発現はまだ報告されていない。MAPC様細胞およびNSでのStm1の発現を調べたところ、Oct 3/4が発現していないにもかかわらずStm1の発現が見られた(図5)。このプライマーセットでは、産物のサイズからStm1のゲノムおよびRNAが検出できることから、RNAを検出したことは明らかである。このことはStm1の発現制御がOct 3/4と独立したものである可能性と、Oct 3/4の上流に位置しOct 3/4が発現される以前の初期未分化細胞を同定するためのマーカー遺伝子になり得ることを示唆している。また、Stm1の相同遺伝子は霊長類であるカニクイザルおよびヒトにも存在する。カニクイザル胚性幹細胞およびヒトEC細胞においてもStm1の発現を確認している。これらの事実は、Stm1の再生医療への応用の可能性を示唆している。

【0299】

(実施例12:未分化細胞の分離)

本実施例では、Stm1の再生医療応用への展開として、Stm1を用いた幹細胞の分離を行った。

【0300】

Stm1が幹細胞すべての未分化細胞マーカーとして応用可能であることから、Stm1のプロモーター制御下に蛍光マーカー遺伝子、GFPを導入しその発現をモニターした。組織細胞そのものまたはその培養細胞からGFPの発現を目印にセルソーターによって組織幹細胞の生細胞を濃縮することが可能になった。また、胚性幹細胞の中でも高い未分化性を維持する細胞のみを選択することが可能である。Stm1の遺伝子機能を欠損した胚は、胚発生致死になることが相同組み換えによる遺伝子ノックアウトの実験から明らかになっている。このことはStm1が未分化性維持のために必須であることを示唆している。

【0301】

したがって、Stm遺伝子のプロモーターもまた、未分化細胞のマーカーとして使用することができることが判明した。

【0302】

(実施例13:Stm遺伝子の改変体の機能)

Stm1遺伝子は、ホメオドメイン、B2反復配列およびWリッチ領域によって特徴づけられる。これらの塩基配列にポイントミューテーション(例えば、配列番号3(マウスStm遺伝子)の500位(TをAにした)、800位(AをTにした)、1200位(TをAにした))を入れることでコードするアミノ酸配列を変更し、それぞれのミューテーションをもとに領域のもつ機能を検索した。領域を部分的に(例えば、500位~550位、800位~850位、および1200位~1250位)ノックアウトすることで、それぞれの機能を検討した。

【0303】

例えば、Stm1は核局在の蛋白質でホメオドメインをもつことから分化誘導蛋白の発現を抑制する働きが推測される。上記変異体について、このホメオドメインを欠損することで、細胞の未分化維持機構が破綻すれば、この領域が制御に重要な役割を果たすことが明らかになる。

【0304】

(実施例14:Stm遺伝子の機能)

コンディショナルノックアウトの実験により初期胚および生殖細胞といった特定の未分化組織細胞での機能に解析する。STM1タンパク質の機能の多くは不明であるが、STM1またはStm1により制御される下流遺伝子の発現調節より細胞を未分化な状態へと変化させる(すなわち、若返らせる)作用があることが実証される。

【0305】

(実施例15：プロモーター配列の同定)

次に、Stm1のプロモーター配列を同定した。

【0306】

転写開始点上流2300bp(−2300bp)から5'側を短く削った長さの異なる5'上流領域に、ルシフェラーゼ遺伝子をつなげた構築物数種を作製し(図11Aを参照)、ルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイは、ルシフェラーゼの発光の強度を測定することによって評価した。その結果、転写開始点から−332bpから−153bpの間に転写を正に制御するエレメントがあることが判明した。

【0307】

次に、そのエレメントを同定するために、転写開始点を基準として−332bpから−153bpの領域に存在する転写因子結合配列の中から、Octamer binding domain(Octモチーフ)およびSox binding domain(Soxモチーフ)が連続して存在している部位に注目した(図11B)。

【0308】

それぞれのドメインまたは両方に3塩基の配列を導入し、ルシフェラーゼ活性を比較した結果を図11Cに示す。この結果から、この部位が転写活性において重要であり、かつ両方のドメインが必要であることが判明した。

【0309】

このうち、プロモーターとして最小限必要な部分は、配列番号32において、−332 20
〜+50位までが記載されているが、−180〜−166位(TTTTGCA TTACA
ATG)であることが判明した(図8および図11Bを参照)。

【0310】

(実施例16：hprtを利用した未分化細胞の選択的除去)

次に、hprtを利用した未分化細胞の選択的除去を行なった。この除去は、以下のよう
なプロトコルを採用した。そのスキーム例を図9に示す。

【0311】

1. 未分化細胞特異的に発現する遺伝子としてStm1のプロモーターに、Hprt遺
伝子を組み込んだ。これは、実施例15において同定したStm1のプロモーター配列(30
配列番号32)にHprt遺伝子を組み込み、Pstm1::HprtORFという核酸
構築物を構築した。

【0312】

Stm1遺伝子の転写開始点から上流2.5kb(LA;左アーム)およびオープンリー
ディングフレーム(ORF)の終点直下(エキソン4の中)か下流3.9kb(RA;
右アーム)に転写制御領域が含まれる。LAおよびRAを含むプラスミド(Pstm1)
を作製した。このプラスミドには、LAとRAとの間に制限酵素BamHI特異的な切断
部位が存在する。このBamHIで消化したPstm1の切断部位を平滑末端処理した。
ここに、平滑末端処理したHprtORFのDNA断片をライゲーションした。制限酵素
解析およびDNAの配列決定によって導入されたHprtORFのDNA断片の方向を決
定し、正方向に導入されたプラスミドをPstm1::HprtORFとしてHprt欠 40
損ES細胞の形質転換に用いた。

【0313】

2. 次に、Hprt欠損ES細胞株を樹立する(例えば、Manipulating
the Mouse Embryo, 3rd ed. Cold Spring Harbor
or, USAを参照)か、または購入する(マウスHml細胞株、Martin Evans
博士から分与していただいた)。このような細胞は、Hprt遺伝子の機能を欠損し
たマウスから樹立した。ES細胞の樹立は一般的な手法を用いて行った。以下に方法を記
載する。受精後3.5日齢のマウスから回収した胚盤胞を白血病阻害因子(LIF)を含
むES細胞培地で培養した。このとき、不活性化したマウスフィーダー細胞をフィーダー
細胞として用いた。増殖してきた内部細胞塊由来の細胞をトリプシン処理して解離し、再 50

びフィーダー細胞上で培養し胚性幹細胞を得た。

【0314】

3. Hprt欠損ES細胞株に上記Pstml::HprtORFをトランスフェクションする。トランスフェクションの条件は以下のとおりである。至適培養条件下で指数増殖しているES細胞を 1×10^7 細胞個準備した。遠心分離により得られた細胞ペレットを1mlの無血清培地に浮遊させた。再び遠心分離した後、1mlの無血清培地に浮遊させた。この細胞浮遊溶液を電極間距離が4mmのエレクトロポレーション用キューベット(BIORAD, GenePulse Cuvette, Order No. 955950)にいれ、5分間氷上にて冷やした。導入するDNA50~100 μ gを細胞溶液に加えよく混ぜた。BIORAD GenePulserにキューベットをセットし、250Volt/500 μ Fの条件で電気刺激を与えた。氷上で5分間冷やした後、ES細胞用の培地に不活性フィーダー細胞を播いてある直径100mmの培養皿に細胞を播いた。細胞をよく攪拌した後、37℃で5% CO₂インキュベーター中で培養した。

【0315】

遺伝子導入処理24時間後、ES細胞用培地にHAT(HAT supplement (GIBCO/BRL Cat No. 31062-011; 100倍溶液中に10mM ヒポキサンチン、40 μ Mアミノプテリン、1.6mMチミジン)を加えたES/HAT培地中で37℃で5% CO₂インキュベーター中で培養した。遺伝子が導入されていないHprt欠損ES細胞は、ES/HAT培地で培養後3日目から死滅し始めた。他方、Hprt遺伝子が導入されたES細胞では、ES/HAT培地でも細胞増殖を続け、選択培地での培養後7~10日目でも肉眼でも識別できる大きさの細胞コロニーを形成した。細胞増殖しないフィーダー細胞は、ES/HAT培地中でも生存し、ES細胞の増殖を補助することができる。出現したHAT耐性ES細胞コロニーをピックアップし解離した後、それぞれをES/HAT培地で培養し直径60mmの培養皿いっぱいに増殖した時点を樹立1代目とした。

【0316】

4. この未分化細胞を、3回無血清培地にて洗浄し、血清を完全に取り除いた。ES細胞培地にラシ血清の代わりにノックアウト血清代替添加物KSR(Knockout Serum Replacement; GIBCO/Invitrogen Cat. No. 10828-028)を加えた培地を用いて、PA6フィーダー細胞上で未分化細胞を8~11日間培養した(Kawasaki et al., 2000, Neuron 28; 31-40, Tada et al., 2003; Dev.Dyn., 227; 504-510.参照)。これにより、神経細胞に分化させた。

【0317】

5. 6-TG培地(例えばSIGMA Cat No. A4660で購入可能)で上記分化すべき細胞を培養する。ここで、Hprt細胞のみ増殖が観察される。上記Pstml::HprtORF遺伝子発現未分化細胞は、選択的に除去される。これは、遺伝子の発現と同時に達成される。

【0318】

6. 未分化細胞混入率を必要に応じて検査する。これは、本発明のStm抗体または市販のOct3/4抗体によって検査することが可能である。

【0319】

7. 分化細胞のみの細胞集団が得られる。これは、使用まで、4℃でまたは-80℃で保存する。

【0320】

(実施例17: GFPを利用した未分化細胞の選択的除去)

次にGFPを利用した未分化細胞の選択的除去を行なった。そのスキームを図10に示す。

【0321】

1. 未分化細胞特異的に発現する遺伝子としてStm1のプロモーターに、GFP遺伝子を組み込んだ。これは、実施例15において同定したStm1のプロモーター配列(

配列番号35)にHprt遺伝子を組み込み、Pstml::HprtORFという核酸構築物を構築する。具体的な手順は以下のとおりである。

【0322】

Stm1遺伝子の転写開始点から上流2.5kb (LA; left arm) とオープンリーディングフレーム (ORF) の終点直下 (Exon 4の中) から下流3.9kb (RA; right arm) に転写制御領域が含まれる。LAとRAとを含むプラスミド (Pstml) を構築した。ここで、LAとRAとの間に制限酵素BamHIの独特の切断部位がある。BamHIで消化したPstmlの切断部位を平滑末端処理する。ここに平滑末端処理したGFP遺伝子 (配列番号35) のDNA断片をライゲーションする。制限酵素解析やDNAのシーケンスにより導入されたGFPのDNA断片の方向を決定し、正方向に導入されたプラスミドをPstml::GFPとしてES細胞の形質転換に用いた。

10

【0323】

2. 細胞を上述のように神経細胞に分化させ、セルソーター (ベクトン・ディッキンソン (BD) FACS Vantage SE) を利用して、GFP陽性の未分化細胞を除いた。

【0324】

3. 分化細胞のみの細胞集団が得られる。これは、使用まで、4℃でまたは-80℃で保存する。通常、細胞は移植直前までの短期保存は4度で行い、長期保存は-80度または-196度 (液体窒素) で行った。

(実施例18: 選択的除去された細胞の移植)

実施例16または17において得られた細胞集団は、そのまま治療に使用できる。この場合、神経細胞に分化させた細胞は、神経の修復に使用可能である。あるいは、例えば肝門脈から注入により肝臓への細胞移植にも応用することが可能である。このように分化させた未分化細胞除去細胞集団は、実際に種々の臓器移植または補填治療に使用することができる。あるいは、腎臓、肝臓などの臓器への再生への利用も可能である。

20

【0325】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

【産業上の利用可能性】

30

【0326】

未分化細胞を実質的に含まない分化細胞の集団が提供される。このような細胞の集団は、種々の治療に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0327】

【図1A】 図1Aは、マウスStm cDNAの模式図を示す。

【図1B】 図1Bは、Stmの胚性幹細胞、EG細胞および12.5日齢胚 (E12.5) における発現パターンを示すノーザンブロット分析の結果である。

【図1C】 図1Cは、成体各組織から回収したtotal RNAを用いたStmに関するRT-PCR解析を示す。

40

【図1D】 図1Dは、Stmにmycタグをつけたコンストラクトを胚性幹細胞に強制発現させた結果を示す。ここで、Ab (+) は、抗体のみを示し、Ab (+) & DAPI は、抗体およびDAPIの存在下での写真を示す。Ab (+) & Actin は抗体およびアクチンの存在下での写真を示す。Ab (+) & DAPI / myc-vector は、mycベクターのみを使用した抗体およびDAPIの存在下での写真を示す。

【図2A】 図2Aは、Stmのホメオドメインを挟むプライマF2-R2の構造を示す。図2Aの下のパネルは、E6.5-E18.5の着床直後から誕生直前までの胚におけるStmのRT-PCR分析を示す。

【図2B】 図2Bは、未受精卵、双実胚および胚盤胞におけるStmのRT-PCR分析を示す。

50

【図2C】図2C左は、E12.5日齢胚の雌雄生殖巣の解析を示す。ここでは、マウス12.5日齢胚の生殖細胞を含む雄雌生殖巣からRNAを抽出し、RT-PCRによりStm1の発現を確認したものが示されている。Oct3/4は未分化細胞のコントロールであり、G3pdhはRNA量のコントロールである。図2C右は、E12.5日齢の生殖巣から精製した始原生殖細胞でのStm1遺伝子の発現を示す。細胞の95%以上がSSEA1陽性細胞であることから、始原生殖細胞が精製されていることが解る。これらの細胞では、陽性コントロールのOct3/4に加えて、Stm1遺伝子も発現していることがRT-PCR解析により示されている。これらの始原生殖細胞でのStm1発現をみると、Oct3/4同様に陽性であった。図2C右；DAPIによる発色を示す。

【図2D】図2Dは、Stm1およびStm2のES細胞、E7.5、E12.5、および胚盤胞における発現を示す。 10

【図2E】図2Eは、抗体を用いたStm1の発現遷移を示す。未分化細胞でのStm1タンパク質発現のウェスタンブロット分析を行った結果である。

【図2F】図2Fは、抗体を用いたStm1の細胞内での発現遷移を示す。

【図2G】図2G上欄は、抗体を用いたStm1とOct3/4との間の細胞内での発現遷移の比較を示す。マウス、サル、ヒトでも観察されていることがわかる。中欄は、マウスES細胞とリンパ球とが混在するサンプルのStm1抗体染色を示す。下欄は、Stm1遺伝子が未分化細胞の核内に局在する様子を示す。

【図2H】図2Hは、Stm1抗体を用いて、マウス初期胚発生でのStm1タンパク質局在性の詳細な解析である。マウス初期胚でのStm1タンパク質の発現。桑実胚（morula）ではすべての割球の核が陽性染色された。着床直前の胚盤胞（blastocyst）では、将来胚体を形成する多能性細胞および内部細胞塊細胞の核が強染されていた。他方、将来胎盤を含む胚体外組織に運命決定付けられた栄養外胚葉（外側を囲む細胞）は全く染色されなかった。着床後3日目の6.5日齢胚では、胚体を形成するエピブラストが陽性染色されていた。特に胚体外外胚葉との境界領域が強く染色された。7.5日齢胚では、Stm1タンパク質の発現は、エピブラストでも原条付近（尾部）に強く見られた。 20

【図3A】図3Aは、Stm1、Stm2、ChrX断片およびChr12断片（Stm3、Stm4ともいう）の概略図を示す。

【図3B】図3Bは、BglIIおよびSacIで消化したときのサザンブロットハイブリダイゼーション解析を示す。 30

【図3C】図3Cは、Ex3F-R2およびInt3F-R2プライマーを用いたゲノムPCR解析の結果を示す。

【図3D】図3Dは、Stm1およびStm2遺伝子の発現解析を示す。StmのcDNAの中央部と3プライム部に、それぞれF4-R4およびF3-R3 RT-PCRプライマーを設定し検出された産物がStm1に由来するものかStm2に由来するものか、または両者に由来するものかを決定した。全てのF4-R4産物がBsaMI制限酵素による消化により、また全てのF3-R3産物がNlaIII制限酵素による消化により切断されることから、これらの産物はすべてStm1遺伝子に由来し、Stm2遺伝子は偽遺伝子であることが示された。 40

【図3E】図3Eは、Stm遺伝子のマッピングを示す。左は概略図であり、右は第7染色体を示す。

【図4A】図4Aは、融合細胞作製の方法を示す。

【図4B】図4Bは、ES細胞と体細胞の融合細胞におけるStm1遺伝子の発現を示す。Stm1の発現が抑制されている胸腺細胞とES細胞を細胞融合すると、ES細胞と同様に融合細胞でもStm1の発現がRT-PCRにより検出される。

【図4C】図4Cは、ES融合細胞における体細胞核由来Stm1遺伝子の発現を示す。豆種間（dom; Mus musculus domesticusとmol; M. m. molossinus）ES融合細胞のmRNAから合成したcDNAをF1-R1プライマー（図1A参照）を用いてPCR増幅した。体細胞由来とES細胞由来の産物 50

は、塩基配列の多型から制限酵素 *SnaBI* への感受性により区別できる。MxR (ES; mol x Thymus; dom) および HxJ (ES; dom x Thymus; mol) 融合細胞において、ともに ES 細胞核由来と体細胞核由来の *Stm1* 遺伝子の発現が検出される。

【図 4 D】図 4 D は、体細胞核移植による *Stm1* 遺伝子の再活性化を示す。Mus musculus domesticus (dom) 由来の除核未受精卵に (M. m. molossinus (mol) x dom) F1 マウス由来の繊維芽細胞の核を核移植し、クローン胚盤胞を作製する。このクローン胚盤胞での *Stm1* の発現を RT-PCR により解析する。

【図 4 E】図 4 E は、核移植細胞における *Stm1* 遺伝子の発現を示す。

19

【図 5 A】図 5 は、脳性幹細胞 (Neurosphere)、胚性幹細胞 (ES)、胸腺、および MB MAPC (多能性をもつ幹細胞) における *Stm*, *Oct 3/4*, *G3pdh* の発現の状態を示す。図 5 A は、マウス *Stm1* とヒト *Stm1* との配列比較を示す。

【図 5 B】図 5 B は、ヒト EC 細胞での *Stm1* の発現である。*Oct 3/4* は未分化細胞のコントロール、*G3PDH* は RNA のコントロールである。

【図 5 C】図 5 C は、マウス 12.5 日齢の脳から得られたマウス神経幹細胞 (Neurosphere) での *Stm1* の発現を示す。Neurosphere 1、2 および 3 はそれぞれに独立に得られたものの *Stm1* の発現である。*G3pdh* は RNA のコントロールである。

20

【図 6】図 6 は、*Stm* を含む遺伝子 (ヒト、マウスおよびサル) のアラインメントである。

【図 7】図 7 は、マウス *Stm1* アミノ酸配列およびマウス *Stm2* アミノ酸配列のアラインメントである。＊は同一の残基を示し、. は類似する残基を示す。

【図 8】図 8 は、*Stm1* のプロモーターの決定のためのスキームを示す。

【図 9】図 9 は、*Stm1* のプロモーターを用いた未分化細胞除去のスキーム例を示す。

【図 10】図 10 は、蛍光およびセルソーターを利用した未分化細胞除去の別のスキーム例を示す。

【図 11 A】図 11 A は、*Stm1* プロモーターを解析する際に用いた短縮型構築物を示す。

30

【図 11 B】図 11 B は、マウスプロモーター領域における *Oct* および *Sox* モチーフの配置を示す。

【図 11 C】図 11 C は、実施例 15 におけるプロモーター領域の同定の際の実験結果を示す。

【配列表ブリーテキスト】

【0328】

(配列表の説明)

配列番号 1 および 2 : ヒト *Stm1* 核酸およびアミノ酸配列

配列番号 3 および 4 : マウス *Stm1* 核酸およびアミノ酸配列

配列番号 5 および 6 : カニケイサル *Stm1* 核酸およびアミノ酸配列

40

配列番号 7 および 8 : ヒト *Stm2* 核酸およびアミノ酸配列

配列番号 9 および 10 : マウス *Stm2* 核酸およびアミノ酸配列

配列番号 11 : F1 プライマー

配列番号 12 : R1 プライマー

配列番号 13 : F2 プライマー

配列番号 14 : R2 プライマー

配列番号 15 : *Oct 4* RT/1 プライマー

配列番号 16 : *Oct 4* RT/2 プライマー

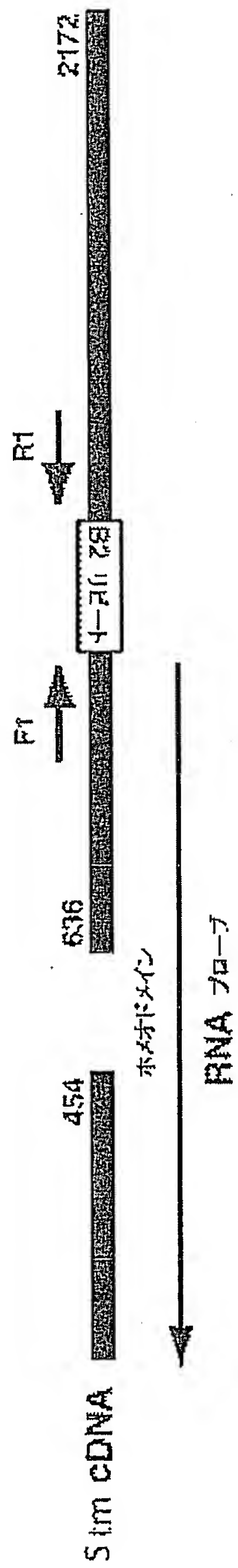
配列番号 17 : *G3PDH*-5 プライマー

配列番号 18 : *G3PDH*-3 プライマー

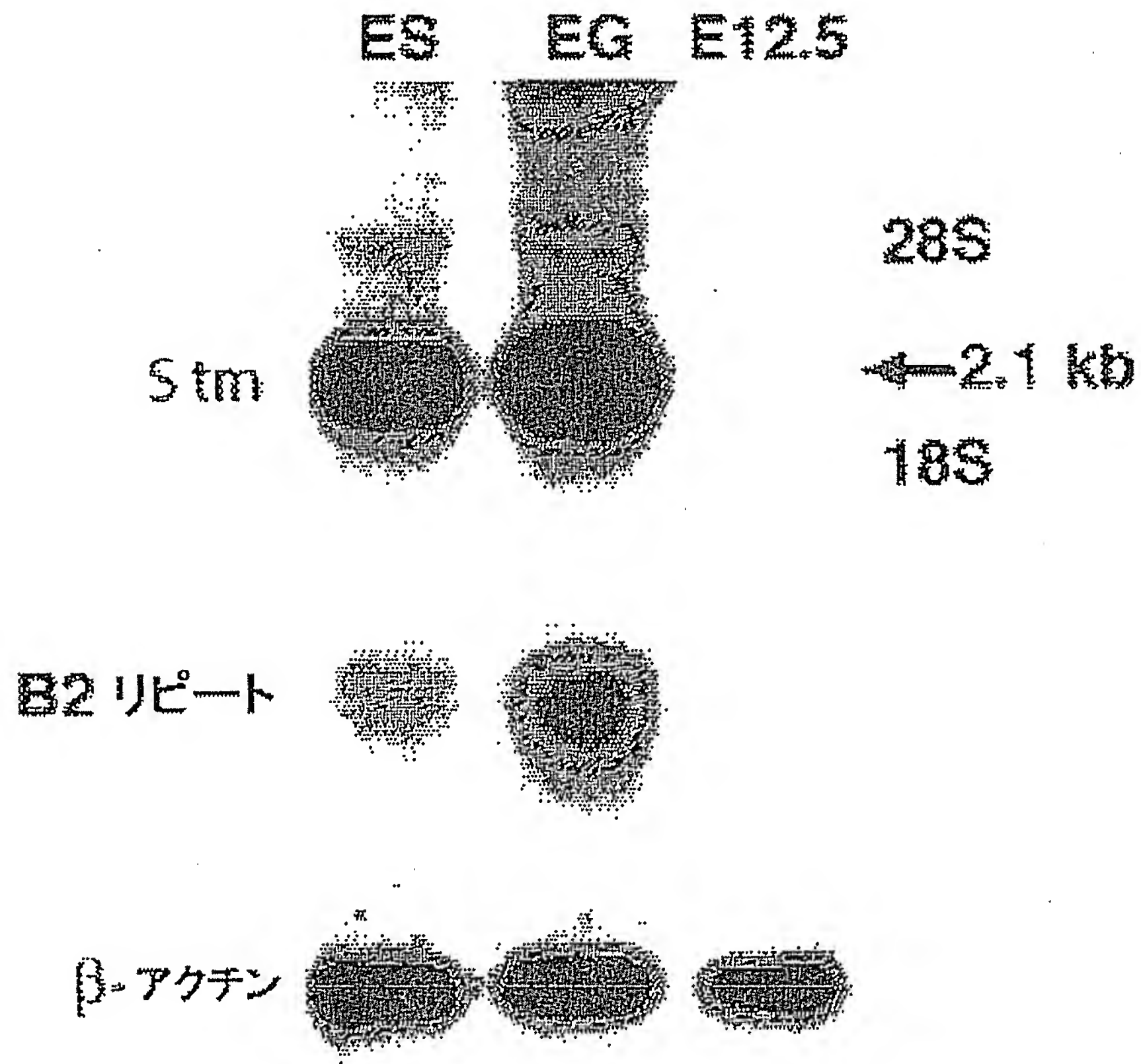
50

配列番号 19 : S t m - i プライマー
配列番号 20 : S t m - r プライマー
配列番号 21 : e x o n 2 F プライマー
配列番号 22 : e x o n 2 R プライマー
配列番号 23 : E x 3 F プライマー
配列番号 24 : I n t 3 F プライマー
配列番号 25 : F 3 プライマー
配列番号 26 : R 3 プライマー
配列番号 27 : F 4 プライマー
配列番号 28 : R 4 プライマー
配列番号 29 および 30 : ラット S t m 核酸およびアミノ酸配列
配列番号 31 : ヒト S t m 1 核酸配列のプロモーター領域の配列
配列番号 32 : マウス S t m 1 核酸配列のプロモーター領域の配列
配列番号 33 : カニクイサル S t m 1 核酸配列のプロモーター領域の配列
配列番号 34 : マウス S t m 1 核酸配列の 5' 上流 - 2 3 0 0 までの配列
配列番号 35 : G F P 遺伝子をコードする核酸配列
配列番号 36 : G F P 遺伝子のアミノ酸配列。

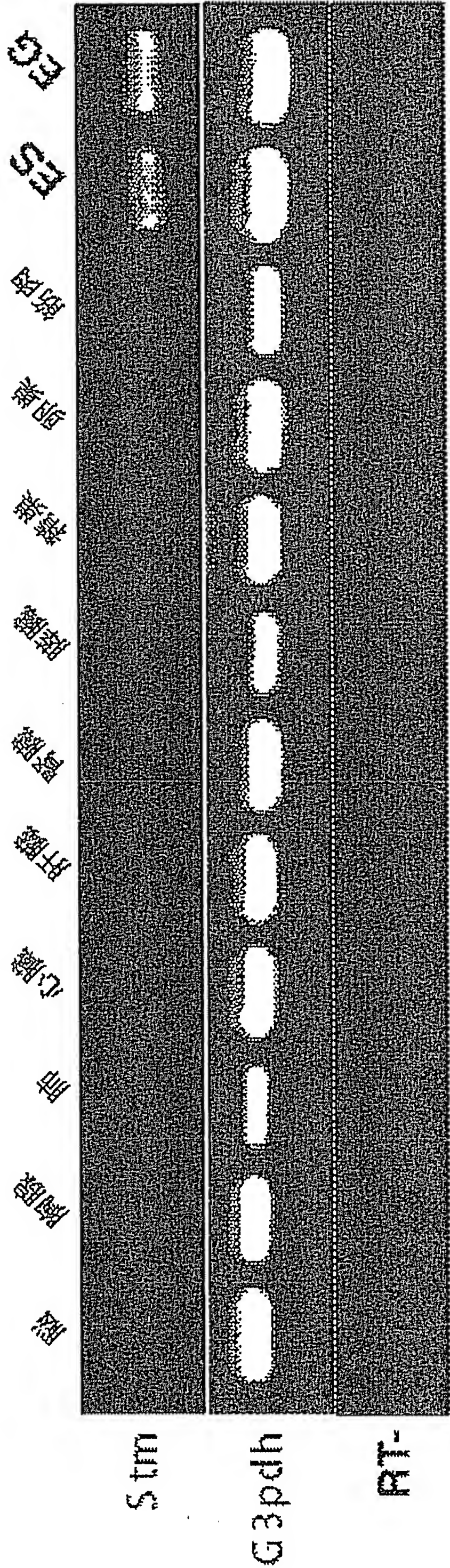
【図 1 A】



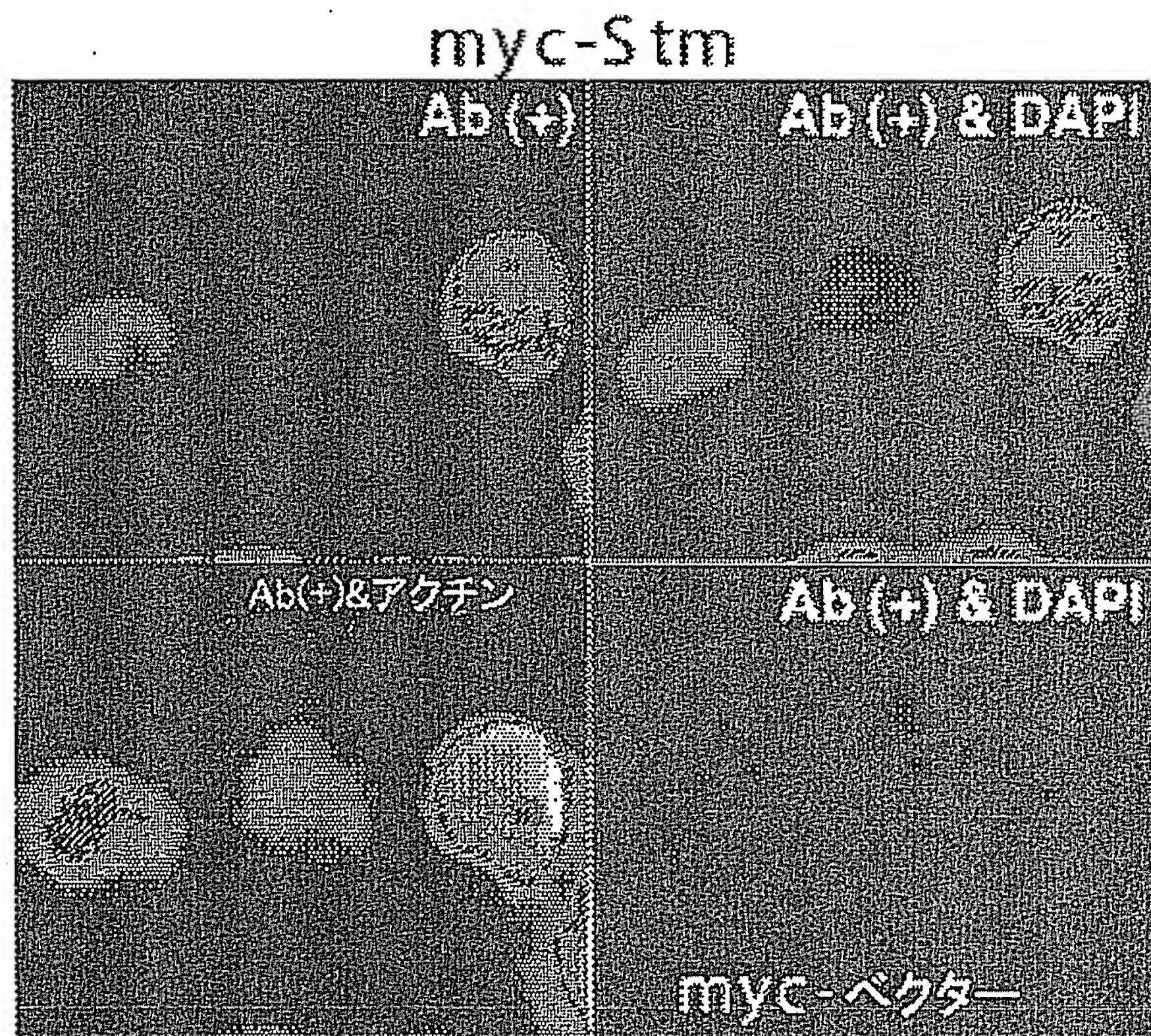
【図1B】



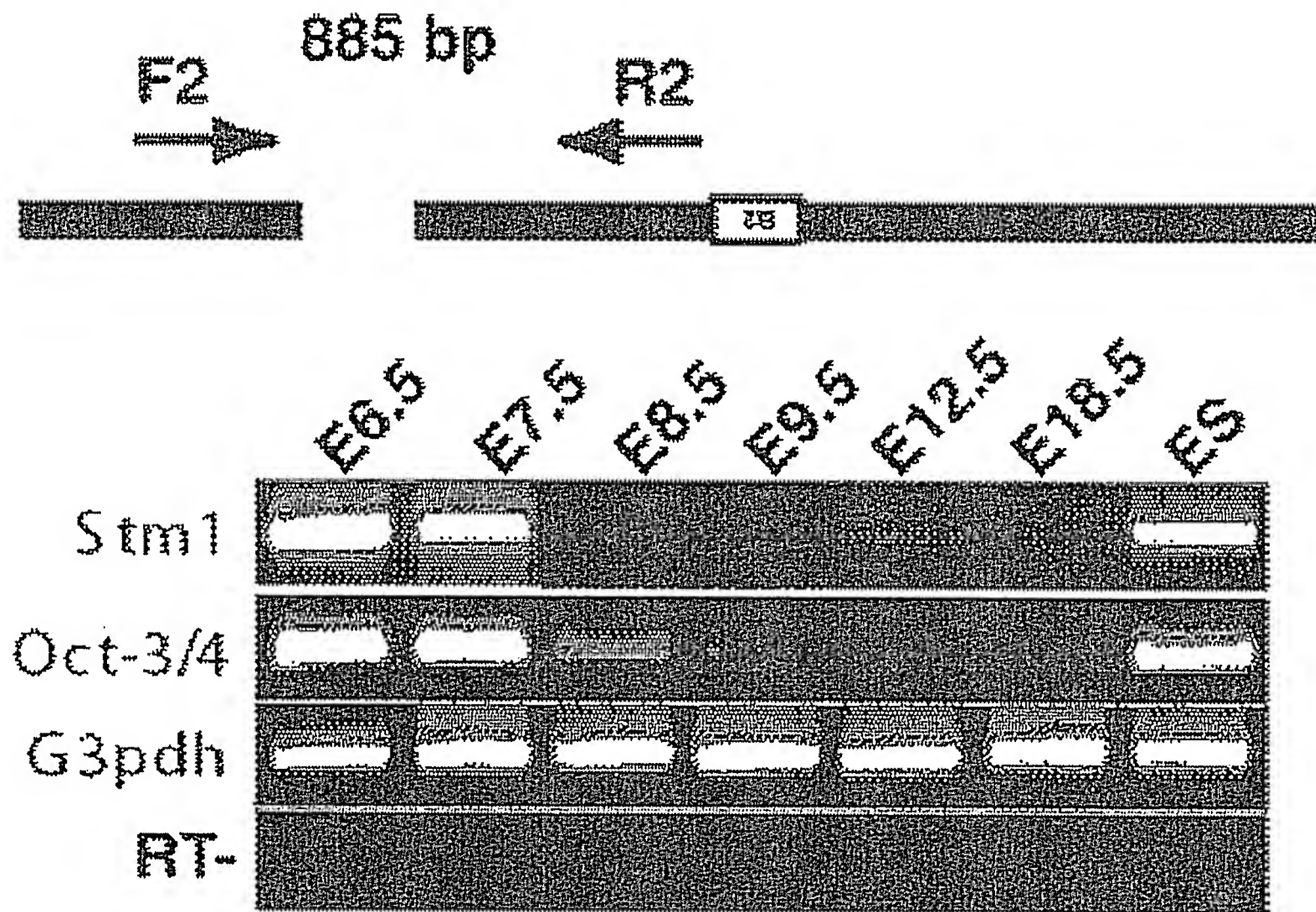
【図1C】



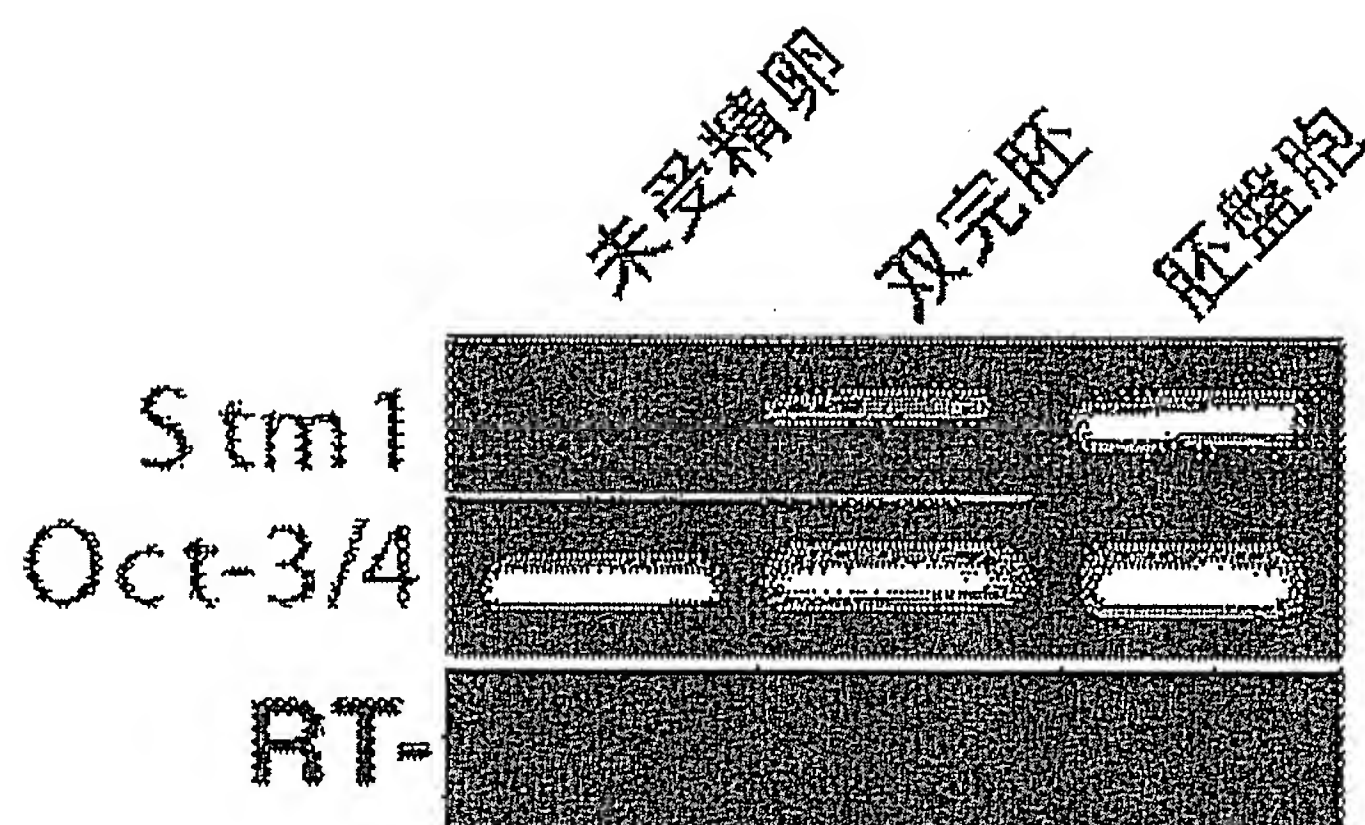
【図1D】



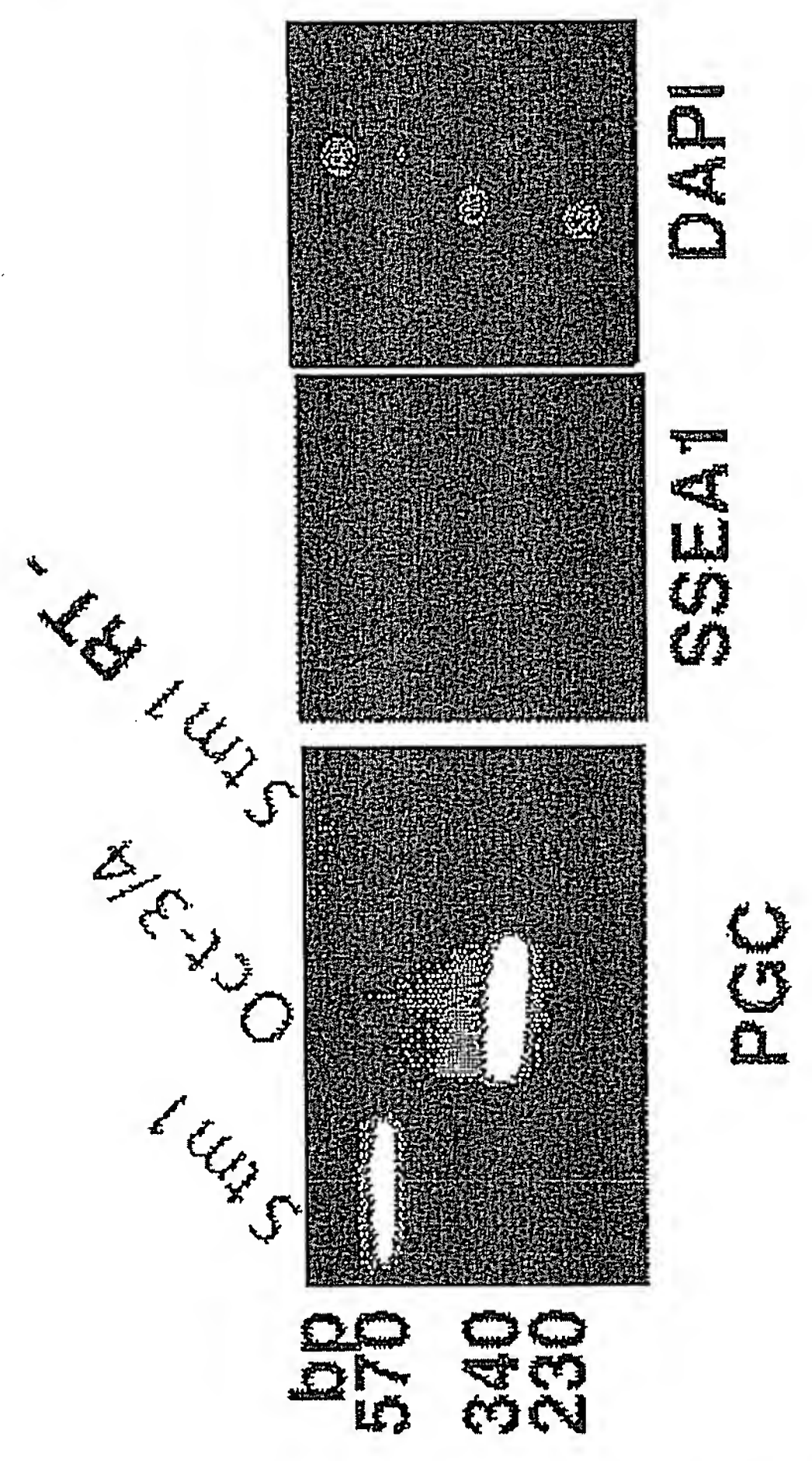
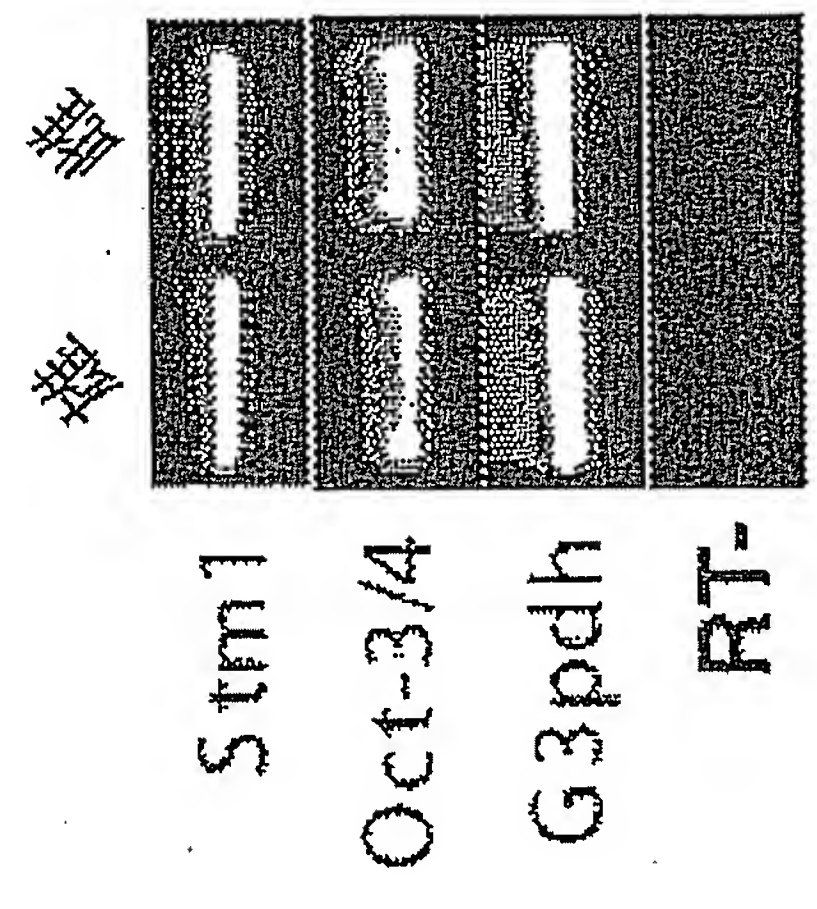
【図 2 A】



【図 2 B】

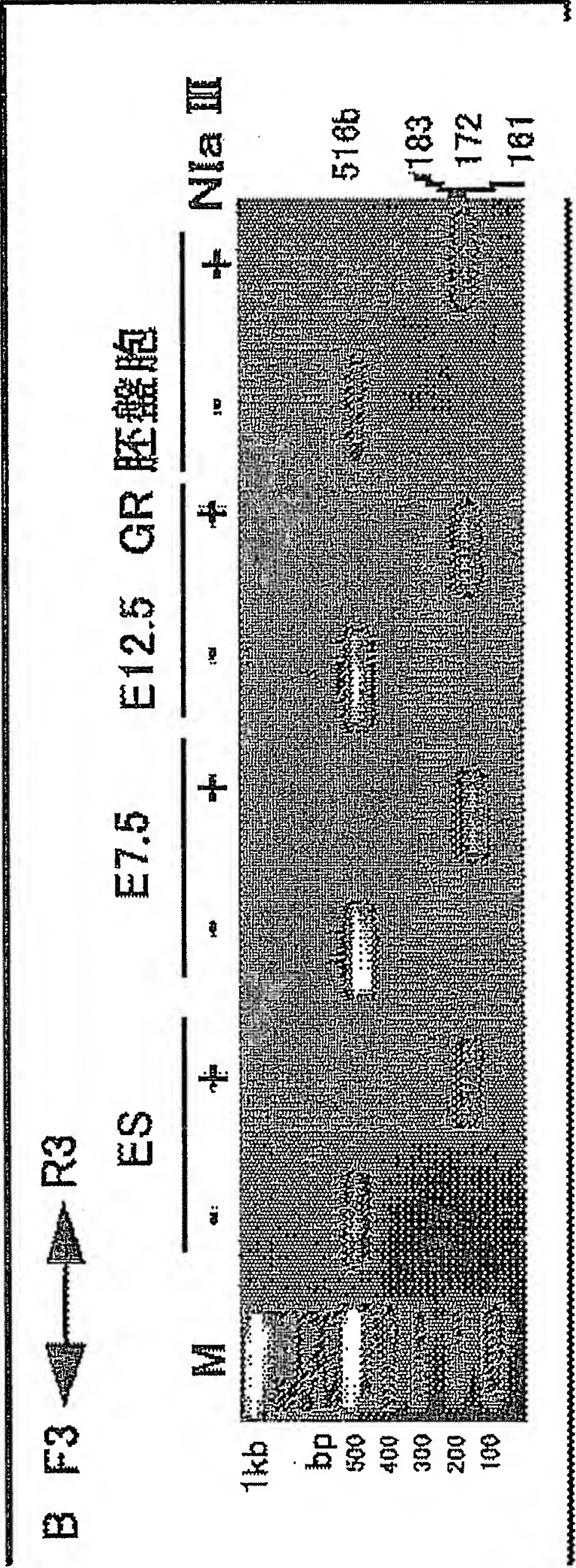


E12.5 GR

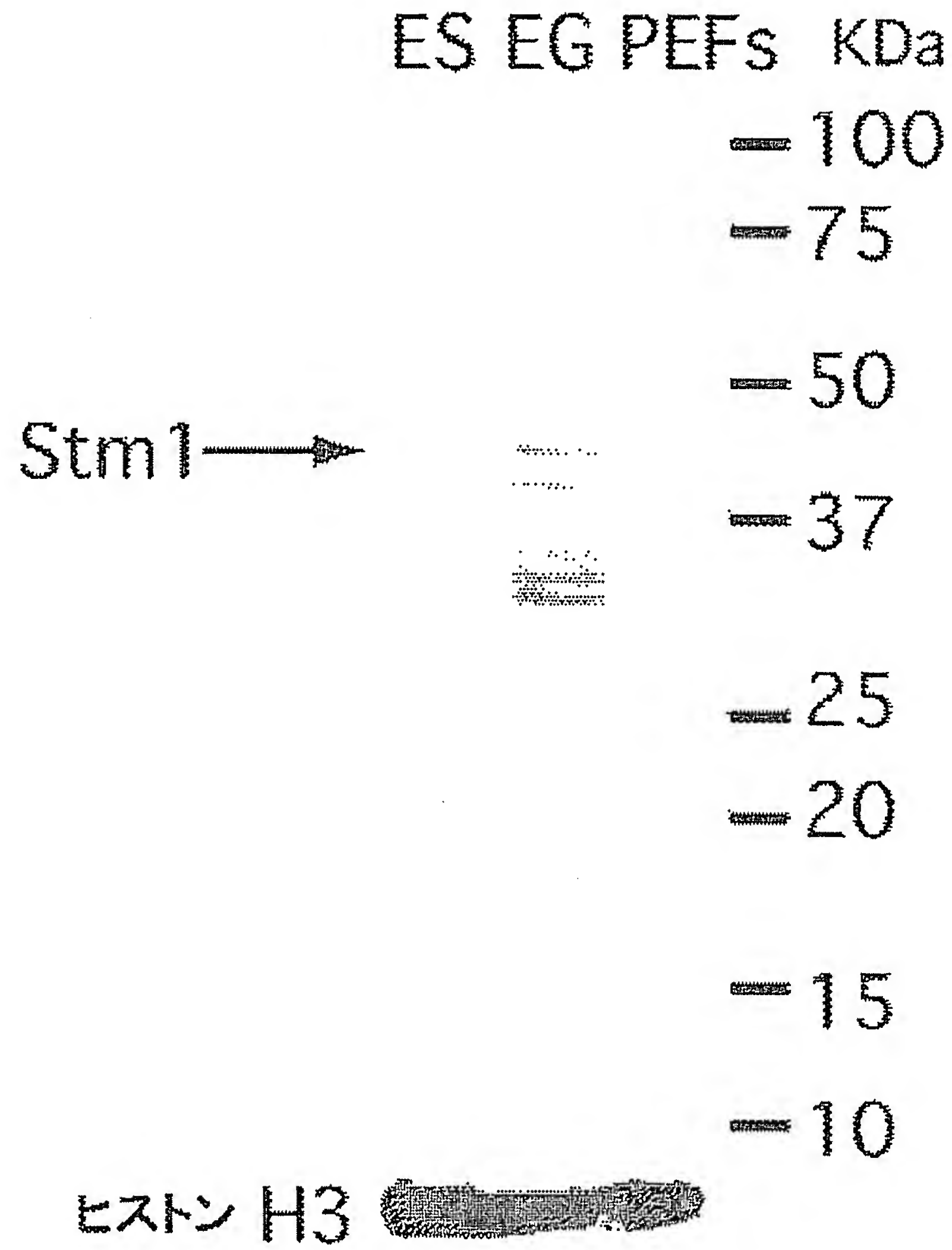


【図 2 C】

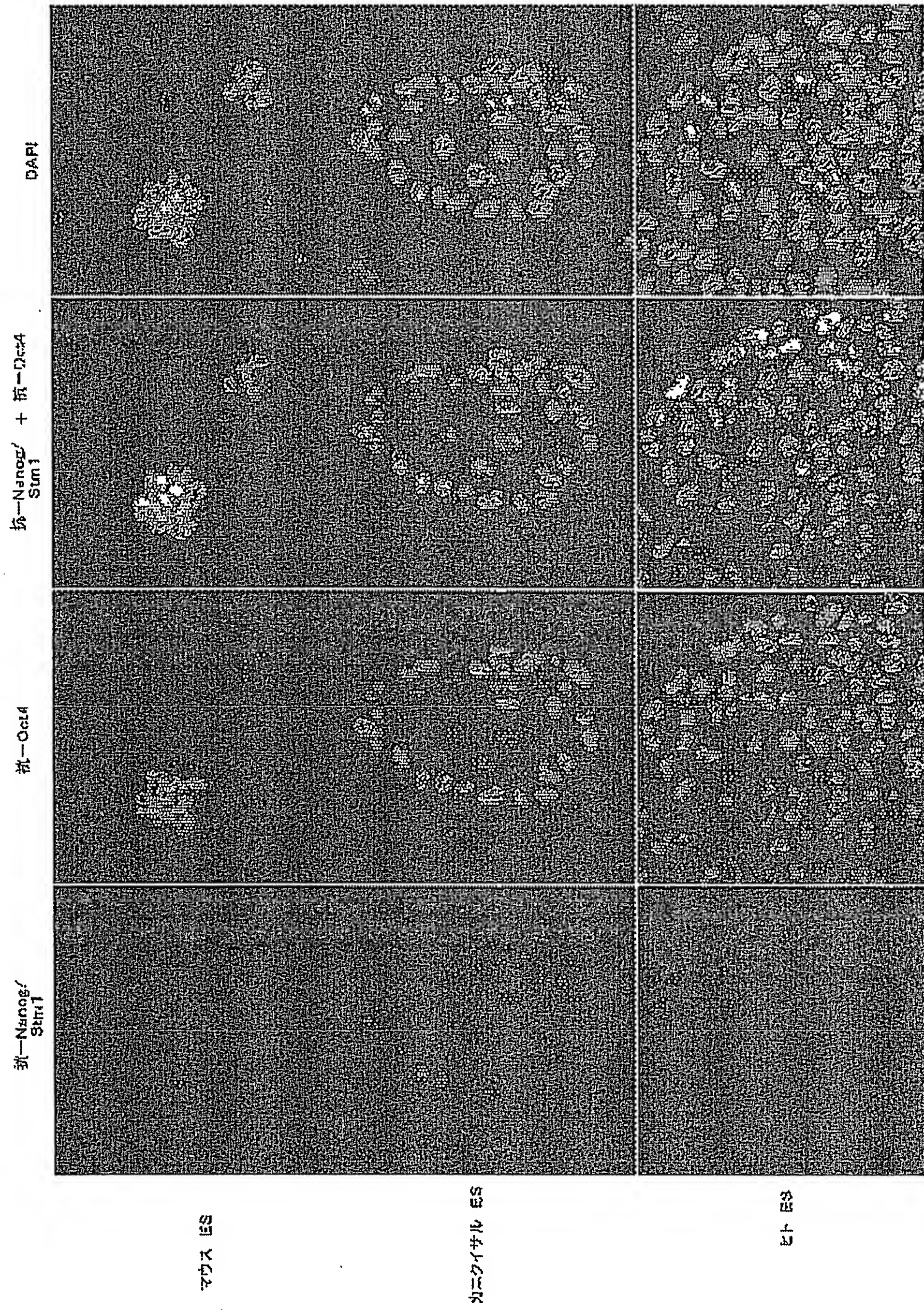
[図 2 D]



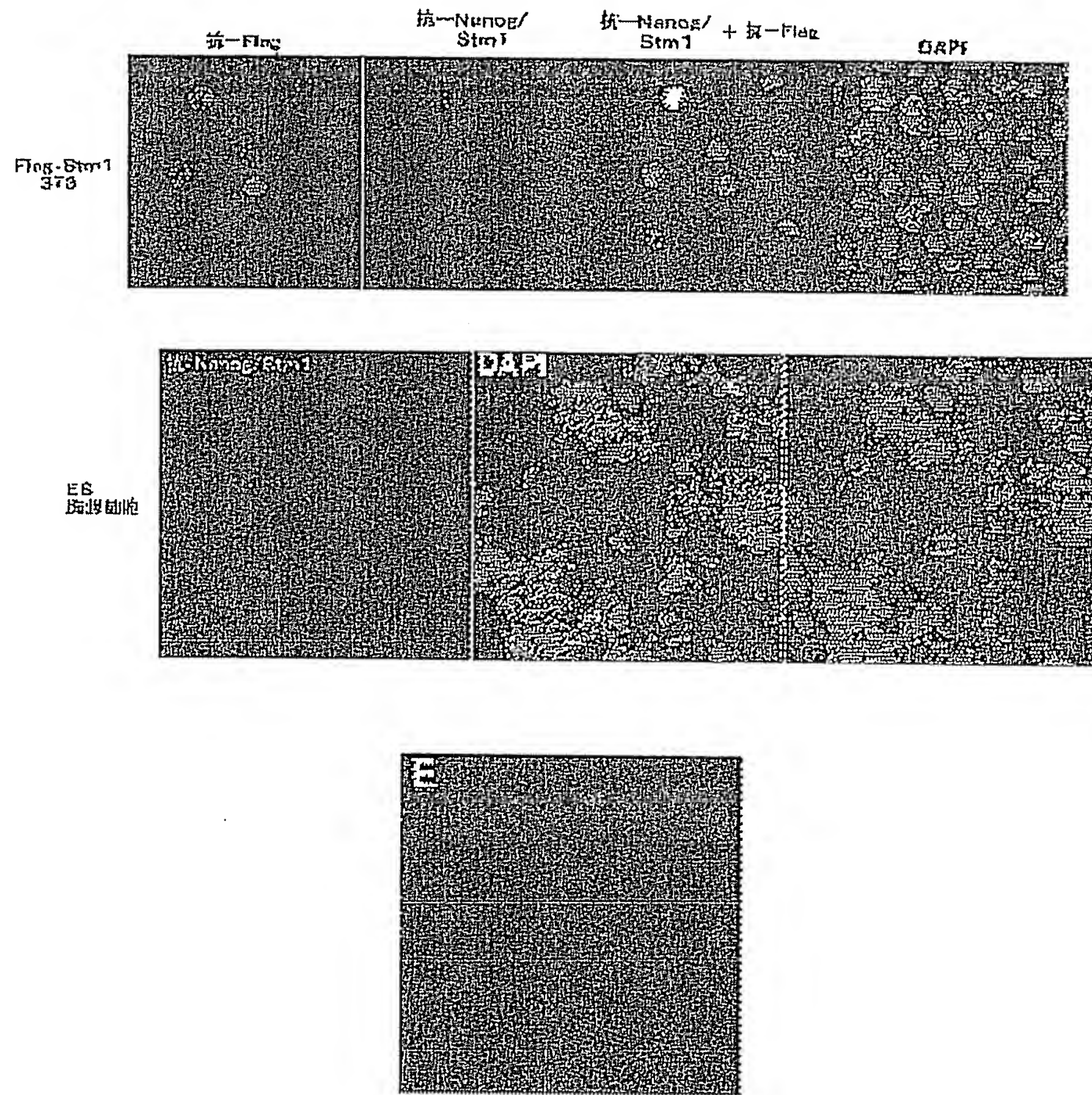
【図 2 E】



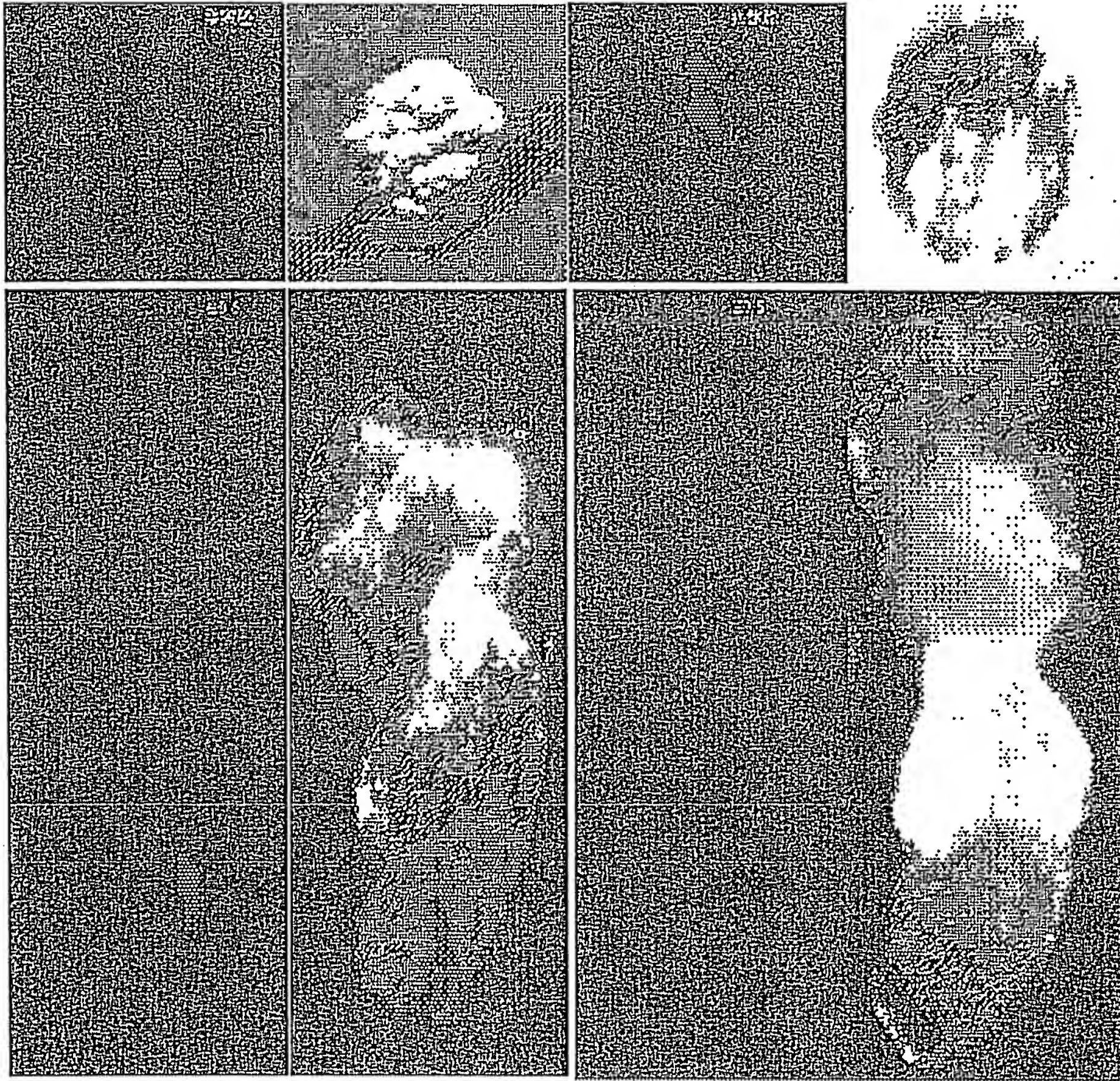
【図 2 F】



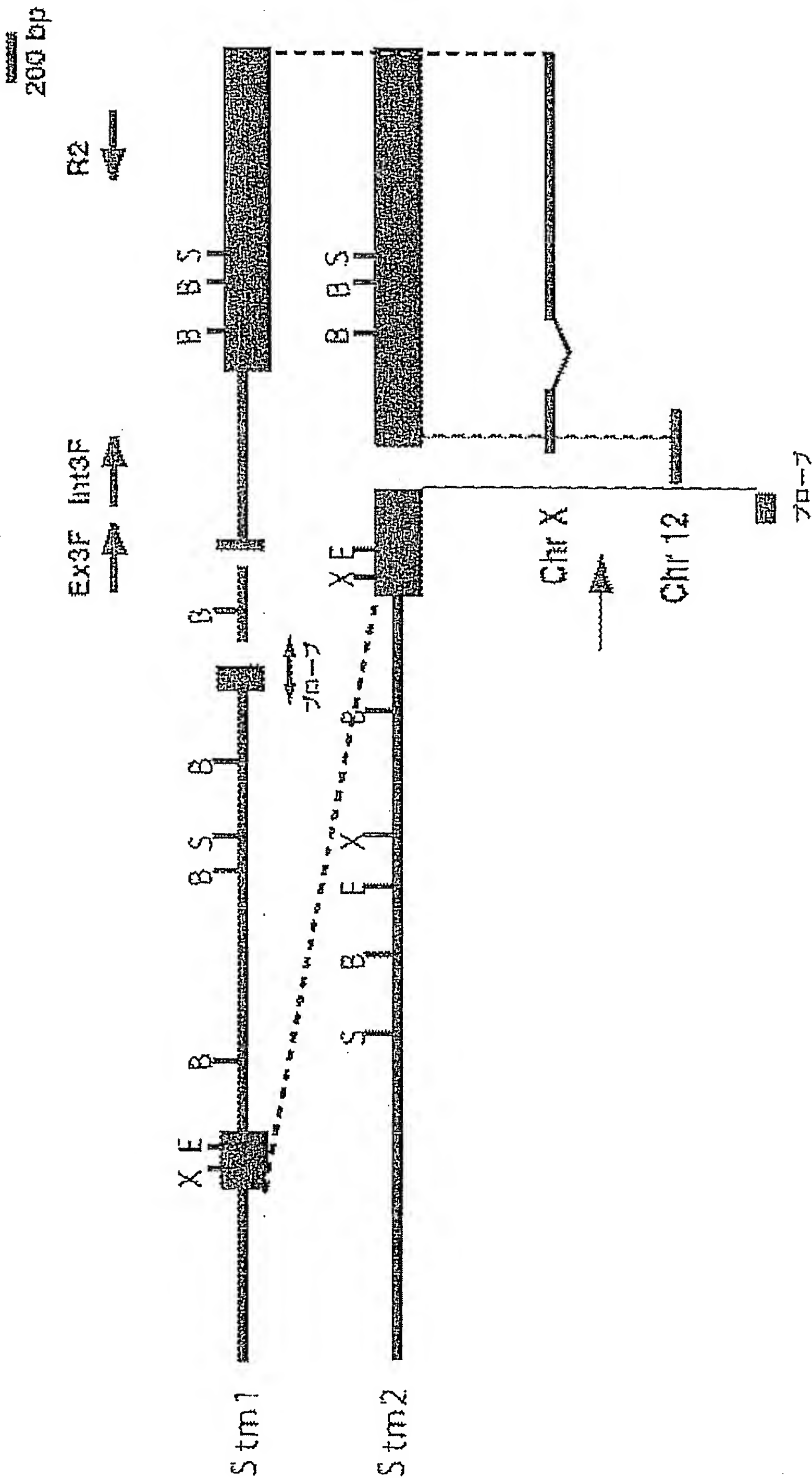
【図 2 G】



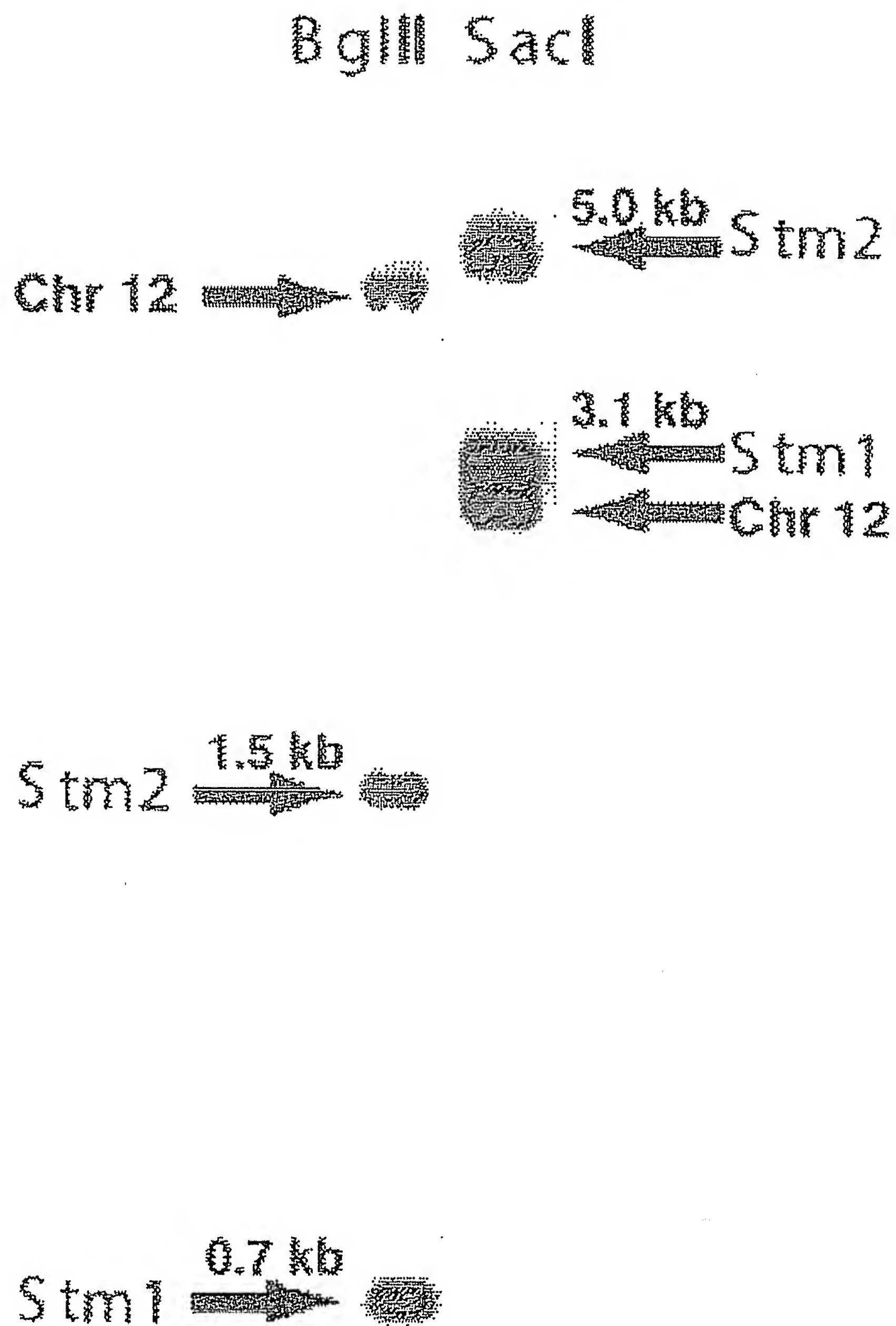
【図 2 H】



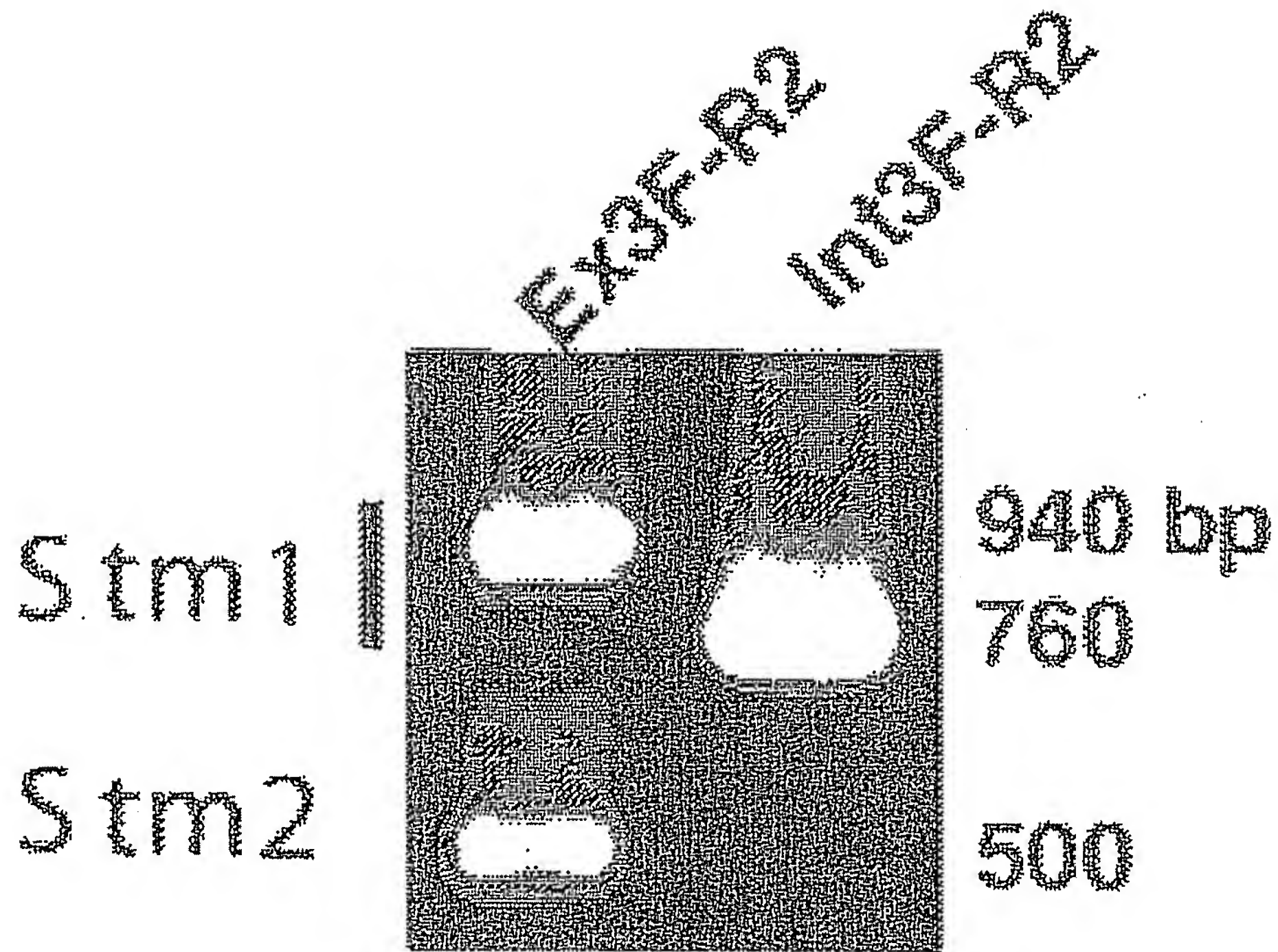
[図 3 A]



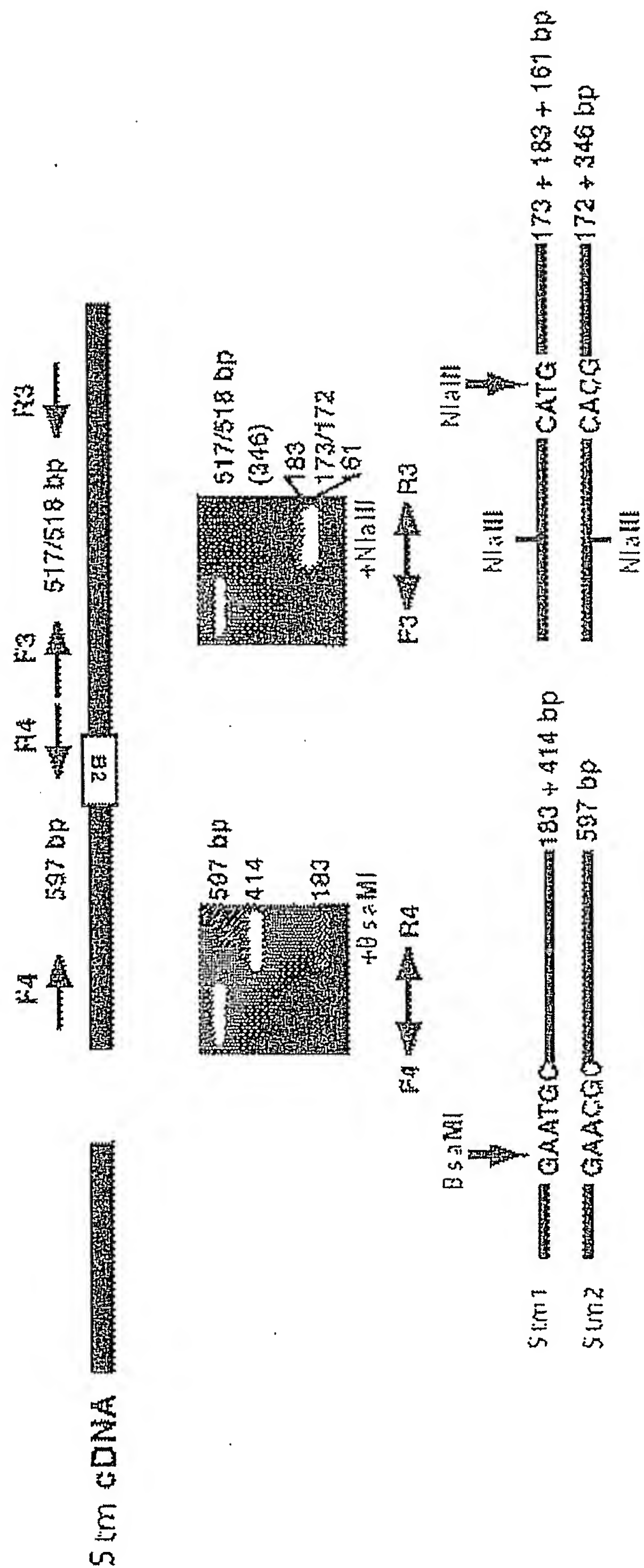
[図 3 B]



【図3C】



【図 3 D】

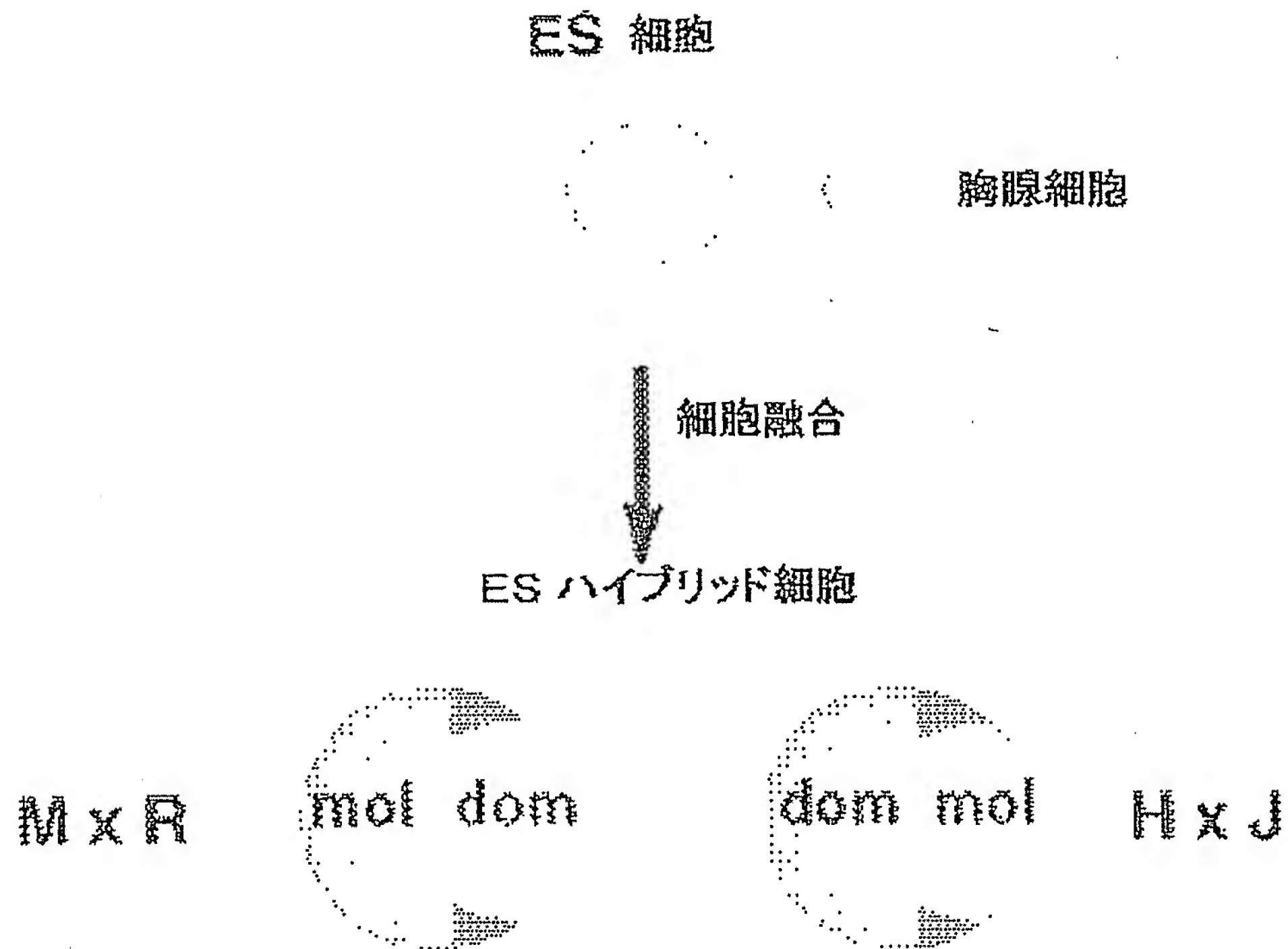


【図 3 E】

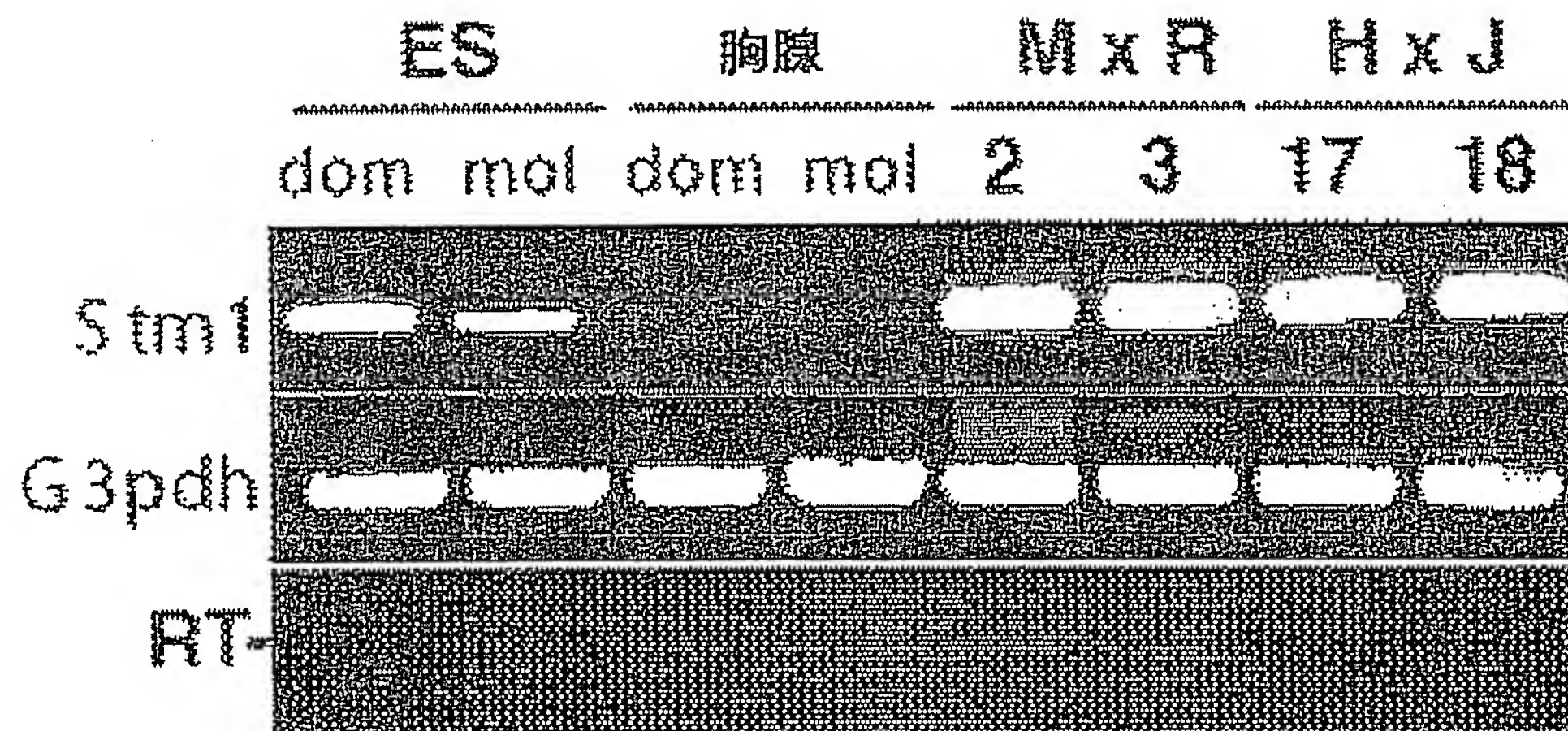


Stm2
H19

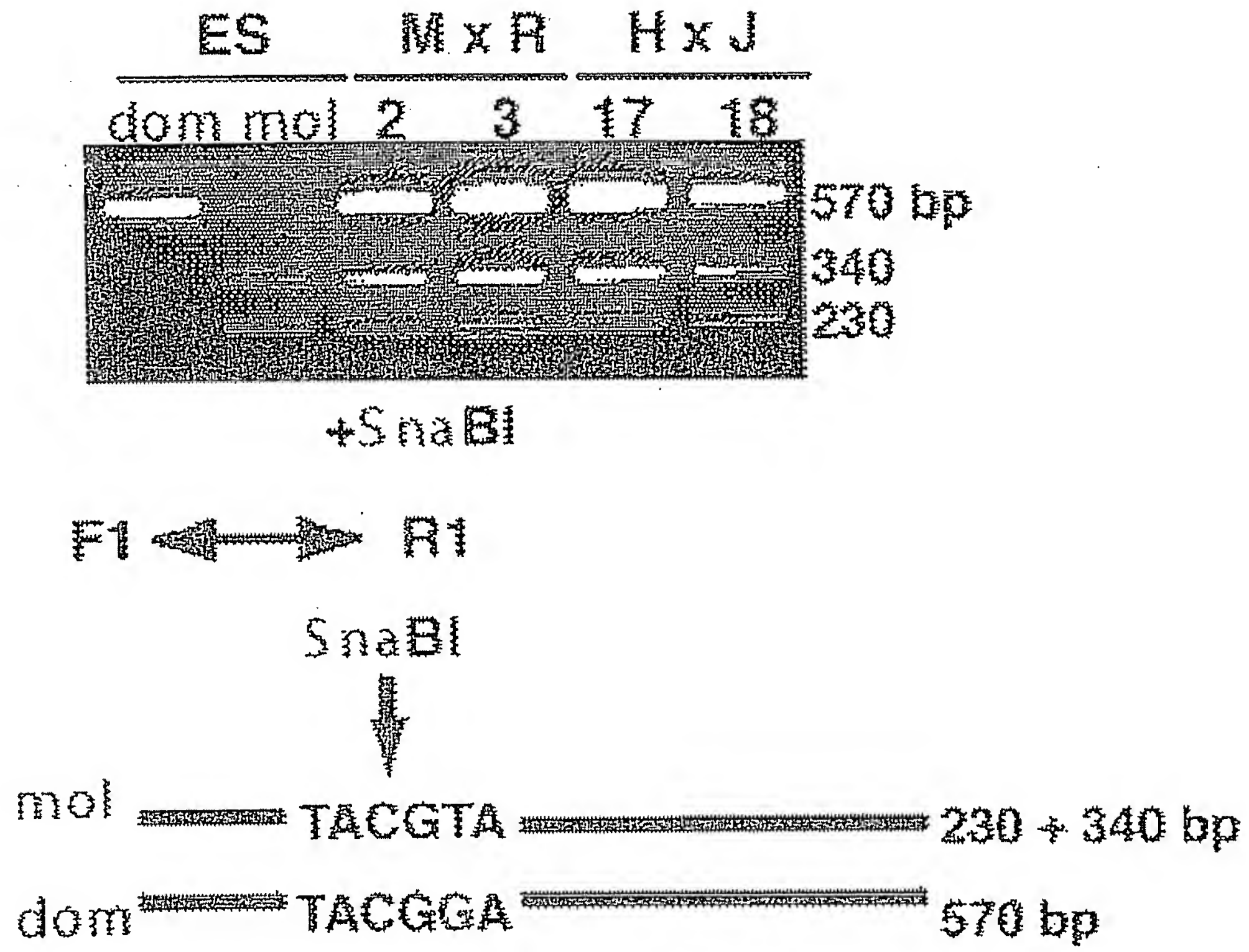
【図 4 A】



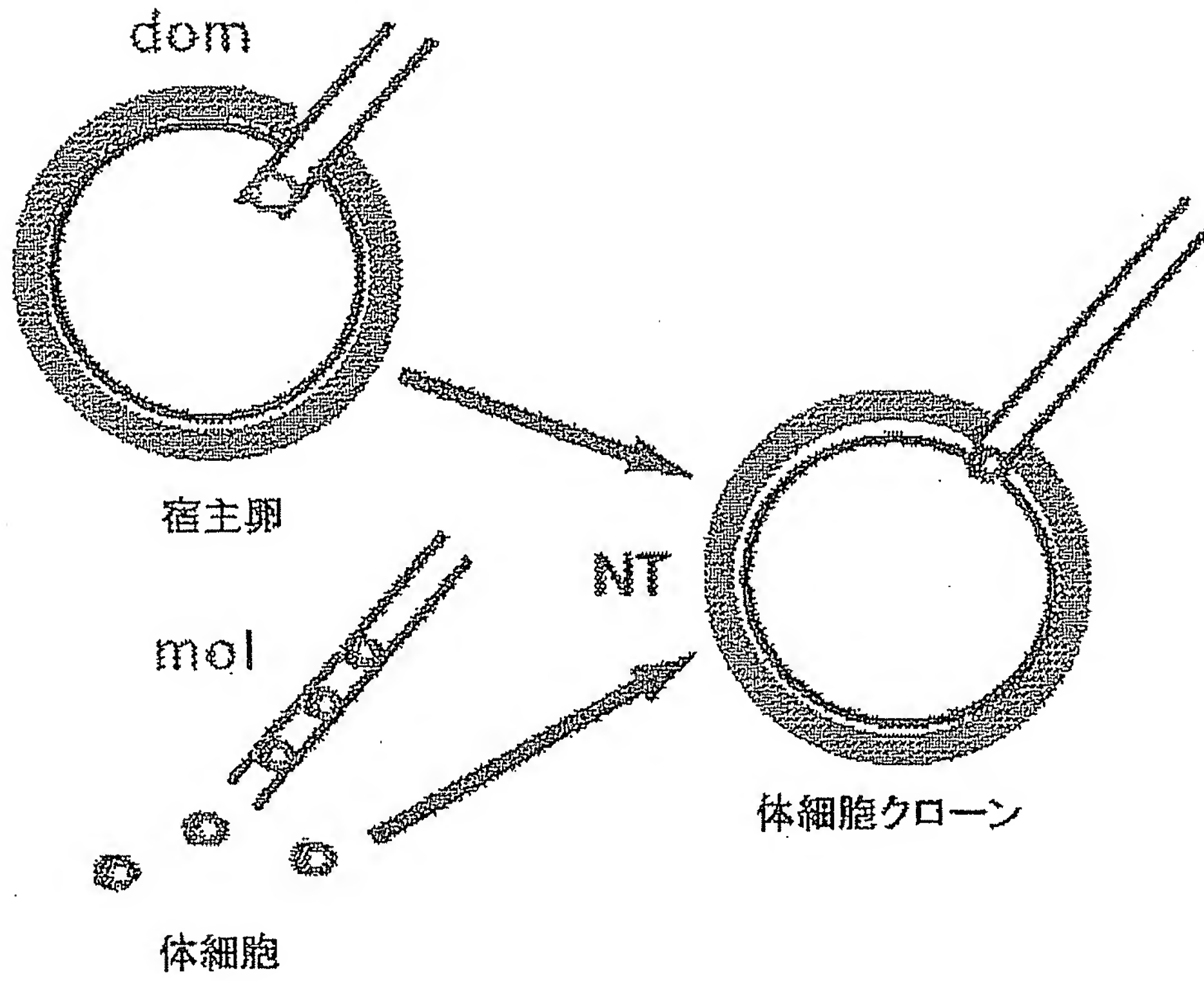
【図 4 B】



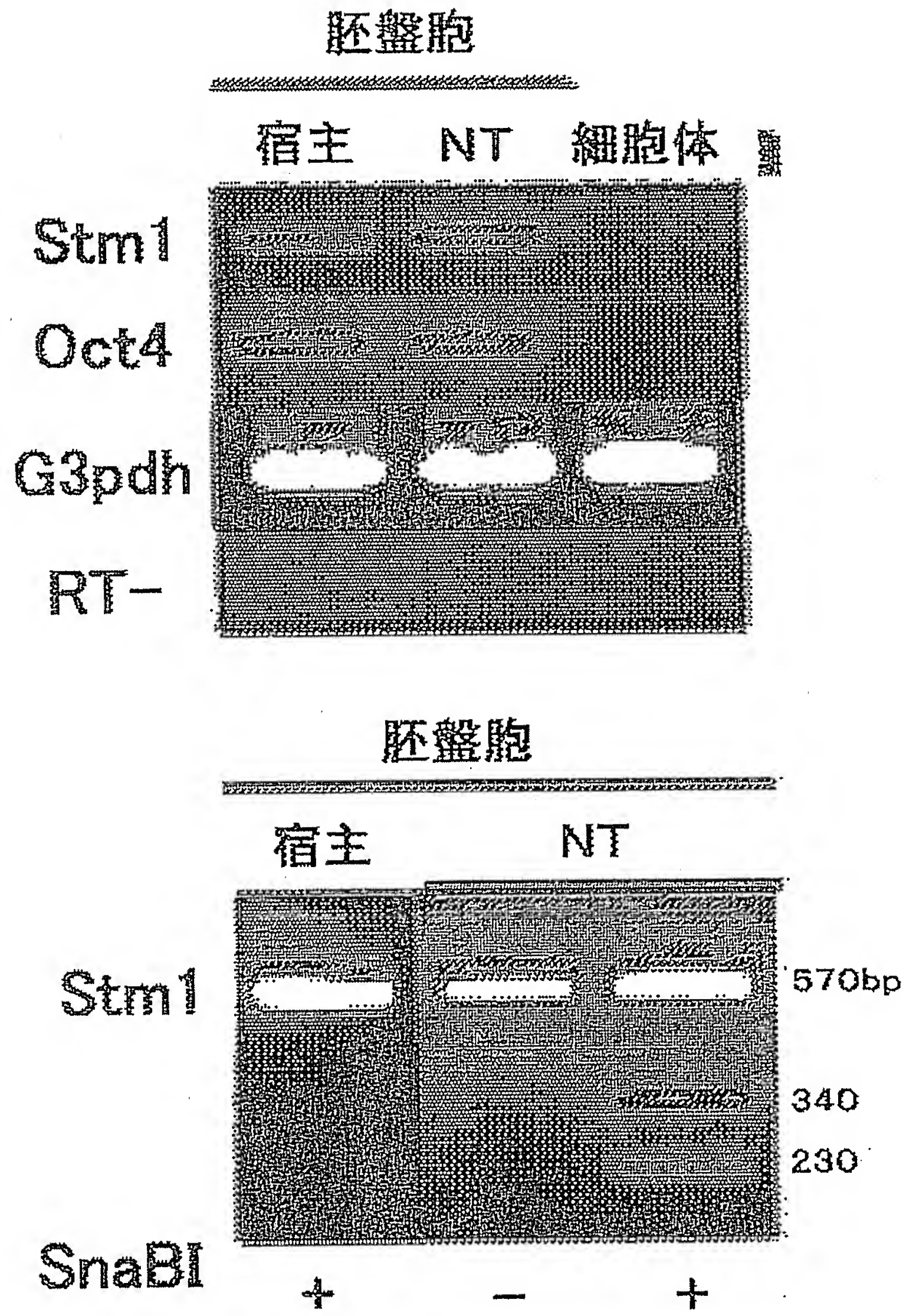
[図 4 C]



【図4D】



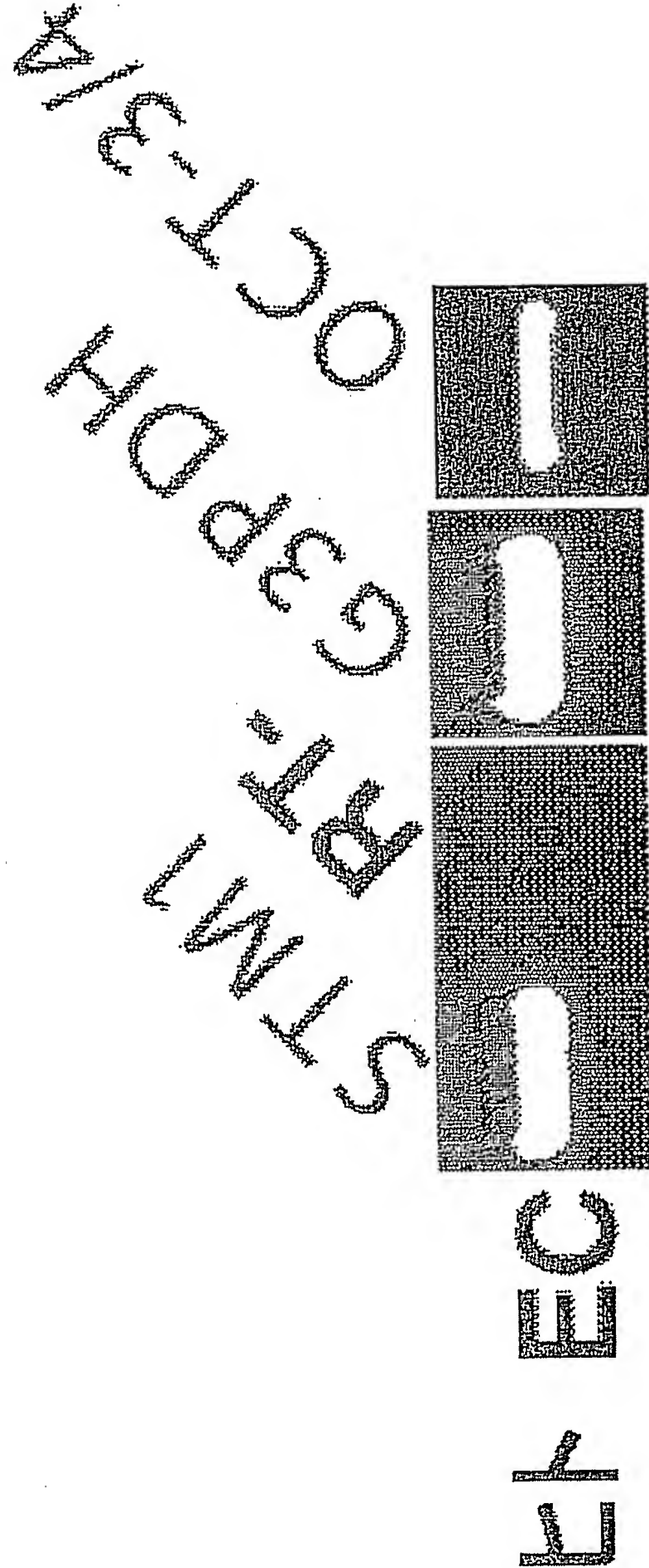
【図 4 E】



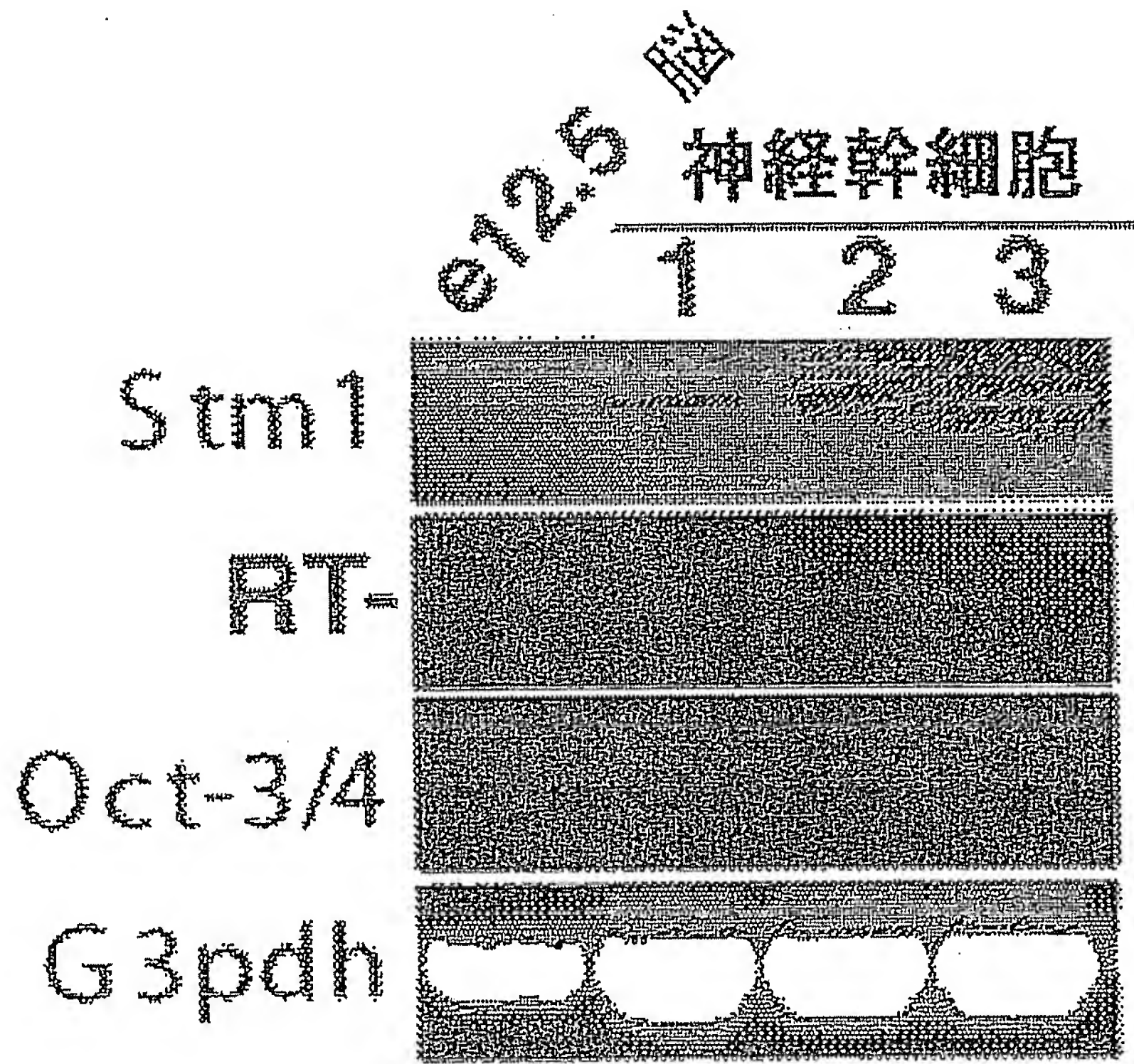
【図 5 A】

マウス 5m1 MSVGLPGPHSLPSSSEASNSGNASSMPAYFHP-JENYSCLOGSATMLCTEAASPRPSSSED
ヒト 5TM1 MSVDPA CPQSLP - CFEASDCKESSPMFVICGPEENYPSELQMSAEMPHTETVSPLPSSND
マウス LPLOGSPDSTSPKOKLSSPEADKGPPEEENKVLARKQKMRITYFSQALCALKDRFQKQK
ヒト LLIQDSPDSTSPKQKQPTS-AENSVAKKEDKVPVKKQKTHITYFSS TQLCYLNDRFQKQK
マウス YLSLQQMQELSSILNLSYKQVKTWFCNQRMKCKRWQKNQWLKTSNGL IKKGSAPVEYPSI
ヒト YLSLQQMQELSNILNLSYKQVKTWFCNQRMKSKAWGKNNWPKNSNGVTOKASAP..TYPSL
マウス HCSYPQGYLYMASGSLSMWG SQTWNTNPTWSSQTWNTNPTWNNOTWNTNPTWSSQAW TAQSWN
ヒト YSSYHQGCLVNP TGNLPMWNSNCTWNNSTWNSNQTGN IQSWSNHSWNTQTWCTQSWNNQAWN
マウス GQPWNAAPLHNFGEDFLQP YVQLQGNFSASDLEVMLEA T.....RESHAHFSTPQALE
ヒトSPFYNCGEESLQSCMQFPNPSASDLEAALEAGEGLNVIGQT TRYESTPQTMD
マウス LFLNYSVTP - PGEI
ヒト LFLNYSMNMQEDV

【図 5 B】



【図5C】



マウス MSVGLPGPHSLPSSEASNSGNASSMPAVFHP. ENYSCQQGSATEMLCTEAA SPRPSSSED 10 20 30 40 50 60
 ヒト MSVDPACQSLP-CFEASDCKESSMPV ICGPEENYPSLQMSSAEMPHTETVSPLPSSMD 70 80 90 100 110 120
 カニクイサル MSVDPACQSLP-CLEASDSKESSMPV ICGPEENYPSLQMSSAEMPHTETVSPLPSSMD 130 140 150 160 170 180
 マウス LPLQCSPPDSSTSPKQKLSPEADKGPBEEENKVLARKQK.MRTVFSQAQLCALKD RFQKQK 190 200 210 220 230 240
 ヒト LL IQDSPDSSTSPKQKQPTA-AENSYAKKEDKVPVKQK TRTVFSS TQLCVLND RFQKQK 250 260 270 280 290 300
 カニクイサル LL IQDSPDSSTSPKQKQPTS-AENSAIKKEDKVPVKQK ARTVFSSAQLCVLND RFQKQK 310 320 330 340 350 360
 マウス YLSLQQMQELSSILNLSYKQVKTWFQNRQRMKCKRWQKNQWLKTSNGL IQKSAPVEYPSI 370 380 390 400 410 420
 ヒト YLSLQQMQELSNILNLSYKQVKTWFQNRQRMKSKRWQKNWPKN'SNGVTQKASAP-TYPSL 430 440 450 460 470 480
 カニクイサル YLSLQQMQELSNILNLSYKQVKTWFQNRQRMKSKRWQKNWPKN'SNGVTQKASAP-TYPSL 490 500 510 520 530 540
 マウス HCSYPQGYLVNASGSLSMWGSQTW TNPTWSSQTW TNPTWNNQTW TNPTWSS QAW TAQSWN 550 560 570 580 590 600
 ヒト YSSYHQGCLVNPFGNLP MW'SNQ TWNNSTW'SNQ TN IQSWS N'HSWNTQTWCTQSWNNQAWN 610 620 630 640 650 660
 カニクイサル YSSCHQGCLVNP TGNLP MW'SNQ TWNNSSW'SNQ TN IQSWS N'HSWNAQTWCTQSWNNQAWN 670 680 690 700 710 720
 マウス GQPWNAAPLHNFGEDEFLQPYVYQIQQNFSASDLEV NLEAT - - - - - RESHAHISTPQALE 730 740 750 760 770 780
 ヒト - - - - - S PFYNCGEESLQSCMQFQPN SPASDLEA AEAAGEGLNVIQQT TRYFSTPQTMD 790 800 810 820 830 840
 カニクイサル - - - - - S PFSNCGEESL QSC L QFQPN SPASDLEA AEAAGEGLNVIQQT TRYLSIPQITVD 850 860 870 880 890 900
 マウス LFLNYSVTP - PGEI 910 920 930 940 950 960
 ヒト LFLNYSMNMQPEDV 970 980 990 1000 1010 1020
 カニクイサル LLLNYSNMNMQPEDV 1030 1040 1050 1060 1070 1080

	10	20	30	40	50	60
stm1	MSVGLPGPHSL	PSSEESNSGNASSM	PAVFHPENYSCLQGS	ATEMLCTEAA	SPRPSS	ED
stm2	MSVGLPGPHSW	PSSEESNSGDASSM	PAVFHPENYSCLQGS	ATEMLCTEAA	SPRPSS	ED

	70	80	90	100	110	120
stm1	LPLQGSPDSS	TPKQKLSSPEAD	KGPEEENKVLARKQ	KMRVFSQAQLCAL	KDRFQKQK	
stm2	LPLQGSPDSS	TPKQKLSSPEAD	KGPEEENKVLARKQ	KMRVFSQAQLCAL	KDRFQKQK	

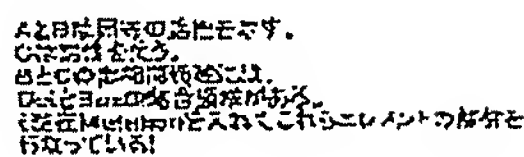
	130	140	150	160	170	180
stm1	YLSLQQMQEL	SSILNLSYKQVKT	WFQNQRMKCKRWQ	KNQWLKTSNGL	IQKGSAPVEYPSI	
stm2	YLSLQQMQEL	SSILNLSYKQVKT	WFQNQRMKCKRWQ	KNQWLKTSNGL	IQKGSAPVEYPSI	

	190	200	210	220	230	240
stm1	HCSYPQG	YLYNASGSL	MMWGSQTW	TNPTWSSQT	WTNPTWNNQT	WTNPTWSSQAWTAQSWN
stm2	HCSYPQG	YLYNASGSL	MMWGSQTW	TNPTWSSQT	WTNPTWNNQT	WTNPTWSSQAWTAQSWN

	250	260	270	280	290	300
stm1	GQPWNAAPL	HNFGEDFLQP	YVQIQQNFS	ASDLEV	NLEATRESHAHF	STPQALEFLNYSV
stm2	GQPWNAAPL	HNFGEDFLQP	YVQIQQNFS	ASDLEV	NLEATRESHAHF	STPQALEFLNYSV

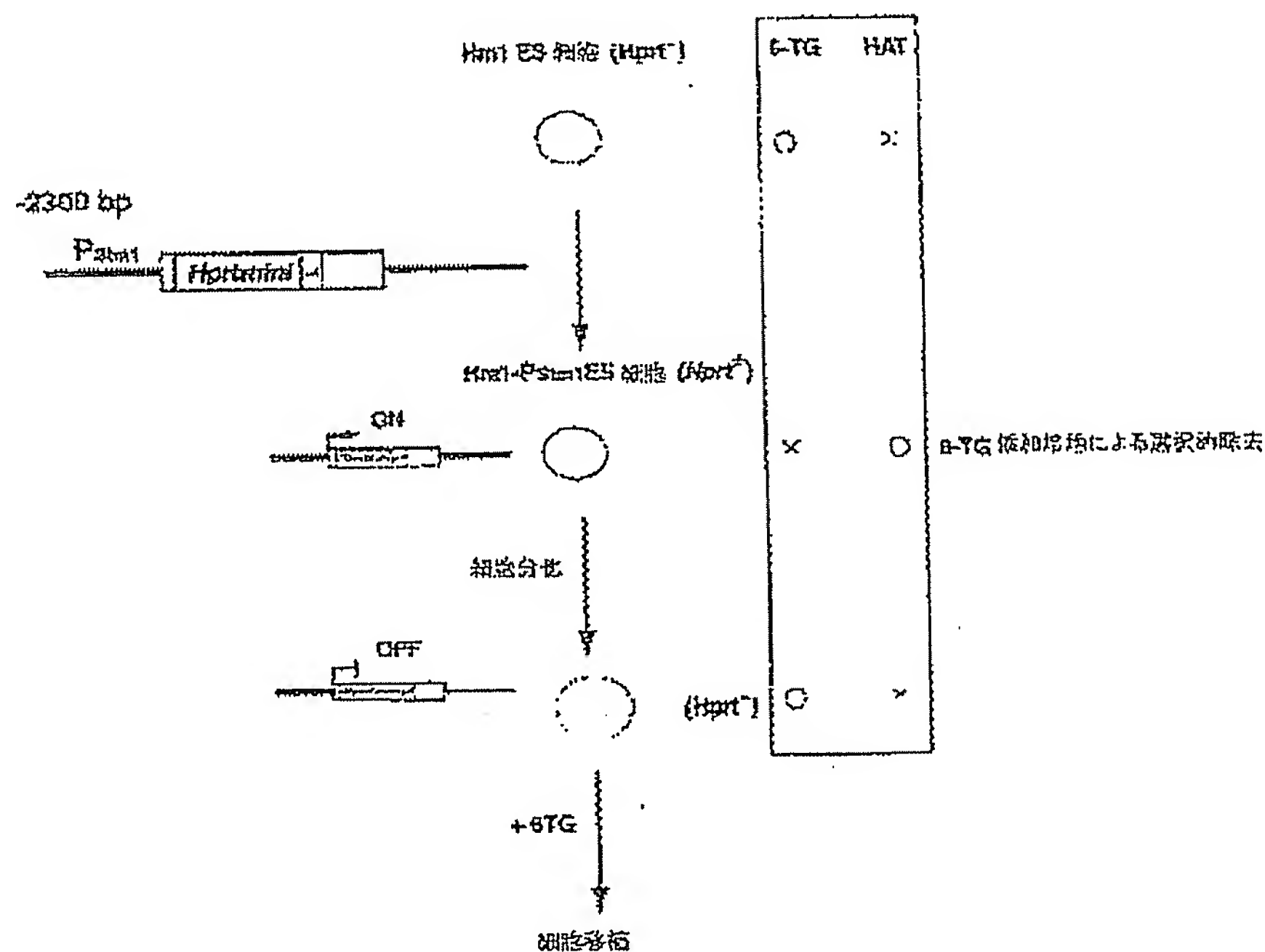
	310
stm1	TPPGEI
stm2	TPPGEI

結果

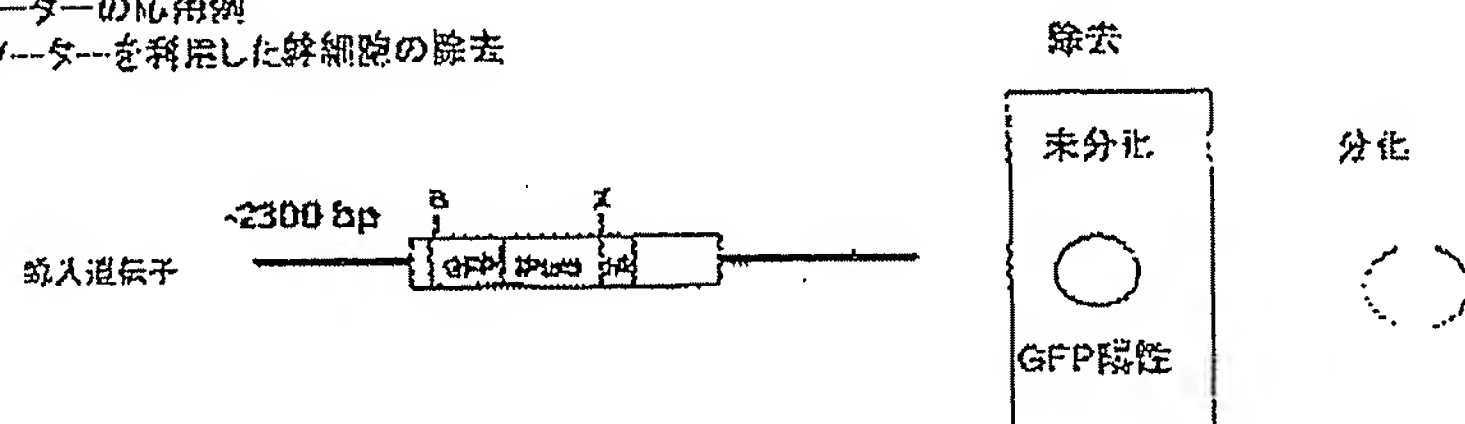


Nanog/Stm1プロモーターの応用例

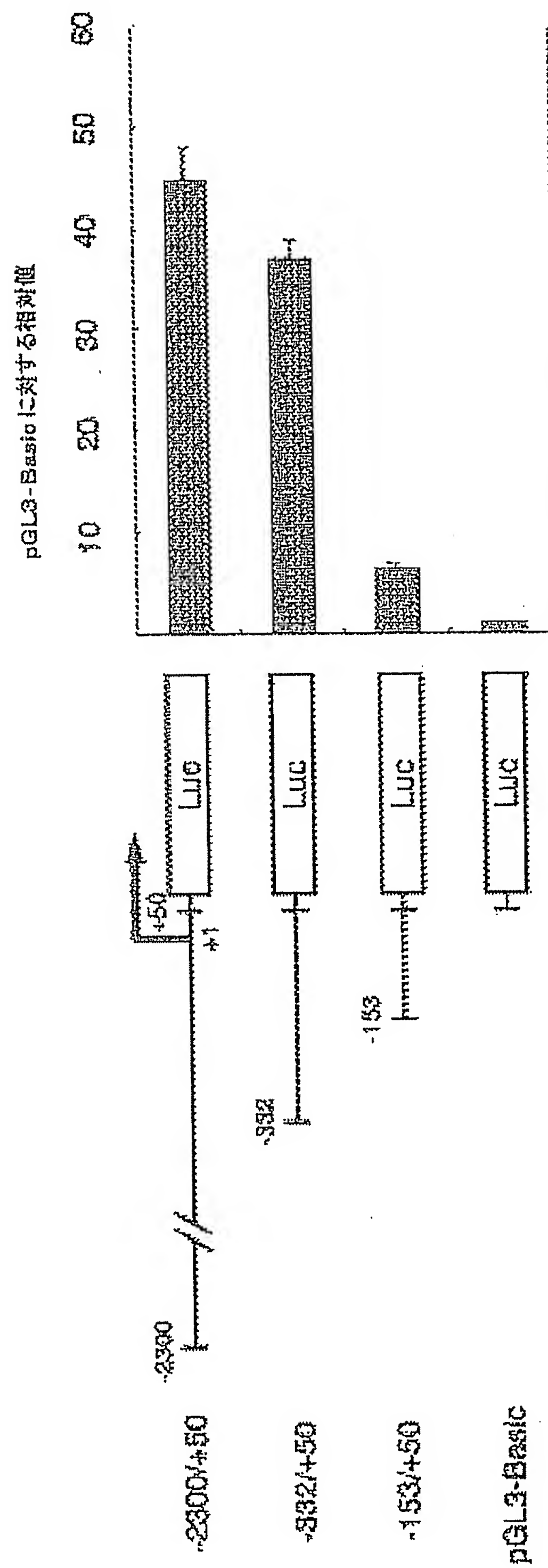
(1) 薬剤耐性の変化を利用した幹細胞の除去



(2) GFP蛍光とセルソーターを利用した幹細胞の除去



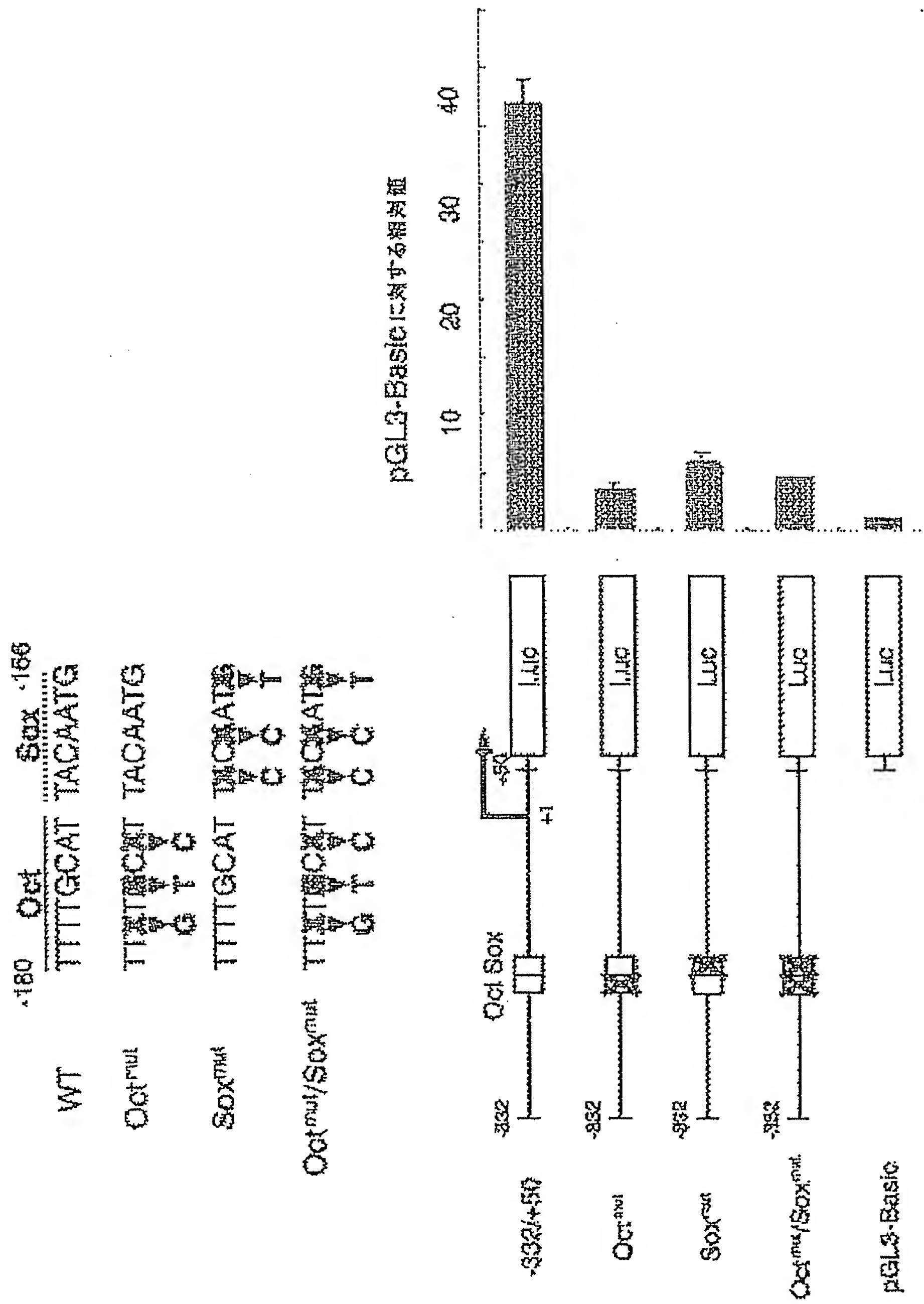
【図 1 1 A】



[1 1 5]

GA GATCGCCQAGG GTCGTGAGGT GCAGCCGTGG TTAAGAATG AATAAGTGA AATGAGGTAA
-332
AGCCTCTTTT TCGCGGGGGG GGATGTCTT ACATCAGAGG ATGCCCCCTA AGCTTTCCCT CCGTCCCAGT
CTGGCTCACC TTAACAGCTTC TTTTCATTA CATGTCCTAT GGTGGACCT GCAGTGGGA TTAAGTCTGA
-200 CCG 50x
ATTACAGGG CTGCTGGGC GTGGTGGCC CTTGGGTGCC TGGAGATA GGGGTGGT AGGTAGGAG
GCTTGAAGGG GGAGGAGCAG GACCTACCT TTAATCTAT GCGTTGAGC CGTTGGCTT CAGATAGGCT
+1
GATTGGTTG GTGCTTCTT CTTCTGTGG GAGGCTGGG
+50

【図 1 1 C】



フロントページの続き

(74)代理人 150062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 150113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 中辻 憲夫

京都府京都市左京区聖護院川原町5 3

(72)発明者 多田 高

京都府京都市左京区聖護院川原町5 3

(72)発明者 多田 政子

京都府京都市左京区聖護院川原町5 3

Fターム(参考) 4B024 AA2G CA04 CA05 DA02 EA02 FA02 FA1G GA11 HA01

4B065 AA90X AA99Y AB01 AC20 BA02 CA45